

Isolierung und Charakterisierung einer Protease aus Trypanosoma Cruzi

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt
dem Fachbereich Chemie
der
Philipps-Universität Marburg/Lahn

von
Vera Bongertz
aus Krefeld

Marburg/Lahn 1977



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Isolierung und Charakterisierung einer Protease aus Trypanosoma Cruzi

**INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)**

**vorgelegt
dem Fachbereich Chemie
der
Philipps-Universität Marburg/Lahn**

**von
Vera Bongertz
aus Krefeld**

Marburg/Lahn 1977



Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Philipps-Universität Marburg / Lahn

als Dissertation angenommen am : 23.6.1977

Tag der mündlichen Prüfung : 6.7.1977

Berichterstatter : Prof. Dr. F. Schneider

Mitberichterstatter : Prof. Dr. H. Kindl

Herrn Prof. Dr. F. Schneider danke ich für die Überlassung des
Themas, seine Anregungen und Korrekturen.

Herrn Dr. K.-D. Hungerer danke ich für die intensive Betreuung
bei der Planung, Durchführung und Diskussion der vorliegenden
Arbeit.

Herrn Dr. O. Zwisler möchte ich für die Beschaffung der Arbeits-
möglichkeit danken.

Inhaltsübersicht

1. Einleitung	9
2. Material und Methoden	21
2.1. Geräte	21
2.2. Chemikalien, Material	23
2.3. Züchtung der <u>I. cruzi</u>	24
2.4. Analytische Methoden	25
2.4.1. Bestimmung der proteolytischen Aktivität	25
2.4.1.1. Mit BAPA als Substrat	25
2.4.1.2. Mit Casein als Substrat	26
2.4.1.3. Mit Hämoglobin als Substrat	26
2.4.1.4. Mit Fibrinogen als Substrat	28
2.4.2. Bestimmung der Esterase-Aktivität	28
2.4.3. Bestimmung der Transamidase-Aktivität	28
2.4.4. Proteinbestimmung	29
2.4.5. Isolierungsmethoden	30
2.4.5.1. Sephadex Gel-Filtration	30
2.4.5.1.1. G-100	30
2.4.5.1.2. G-200	30
2.4.5.2. Ionenaustausch-Chromatographie	31
2.4.6. Methoden zur Bestimmung des Reinheitsgrades	31
2.4.6.1. Disk-Elektrophorese	31
2.4.6.2. Immunelektrophorese	32
2.4.6.3. Bidimensionale Elektrophorese	33
2.4.6.4. Immunodiffusion nach Ouchterlony	34
2.4.7. Methoden zur Bestimmung der Physiko-Chemischen Eigenschaften	34
2.4.7.1. Bestimmung der Konditionen im BAPA-Test	34
2.4.7.1.1. pH-Optimum	34
2.4.7.1.2. Temperatur-Optimum	34
2.4.7.1.3. Optimale Reaktionszeit	34

2.4.7.2. Bestimmung des Isoelektrischen Punktes	34
2.4.7.3. Methoden zur Bestimmung des Molekulargewichtes	35
2.4.7.3.1. Sephadex Gel-Filtration	35
2.4.7.3.2. SDS-Elektrophorese	36
2.4.7.3.3. Gradienten-Gel-Elektrophorese	37
2.4.7.4. Bestimmung der Michaelis-Konstante für BAPA	38
2.4.8. Hemmung des Tc-Enzyms	38
2.4.8.1. Chemische Hemmung	38
2.4.8.2. Sauerstoffeinfluss	38
2.4.9. Aktivierung des Tc-Enzyms	39
2.4.10. Chemische Zusammensetzung des Tc-Enzyms	39
2.4.10.1. Aminosäure-Zusammensetzung	39
2.4.10.2. Kohlehydrat-Analyse	39
2.4.10.2.1. Nach Park-Johnson	39
2.4.10.2.2. Chromatographische Bestimmung	40
2.4.11. Spezifität des Tc-Enzyms	41
2.4.11.1. Spaltung von Aminosäure-p-nitroaniliden	41
2.4.11.2. Spaltung von Tryptophan-naphtylamid	41
2.4.11.3. Spaltung von Oligopeptiden	42
2.4.11.4. Fingerprint	43
2.4.12. Immunologische Charakterisierung des Tc-Enzyms	44
2.4.12.1. Herstellung des spezifischen Antiserums	44
2.4.12.1.1. Gegenstromelektrophorese	44
2.4.12.1.2. IHA-Test	44
2.4.12.1.3. Latex-Test	45
2.4.12.2. Aktiver Mäuseschutzversuch	46
2.4.12.3. Versuche mit permanenten Zellkulturen	49
2.4.12.3.1. Eindringung von <u>T. cruzi</u> in Zellkulturen	49
2.4.12.3.2. Einfluss des spezifischen Antiserums auf das Eindringen der Trypanosomen in Zellkulturen	50
2.4.13. Bestimmung von Proteasen anderer Flagellaten	50

3. Ergebnisse	52
3.1. Isolierung des Tc-Enzyms	52
3.1.1. Lokalisierung des Tc-Enzyms	52
3.1.2. Ammoniumsulfat-Fällung und Dialyse	53
3.1.3. Sephadex G-100 Gel-Filtration	55
3.1.4. Sephadex G-200 Gel-Filtration	55
3.1.5. Ionenaustausch-Chromatographie	57
3.1.6. Kombination beider Verfahren	58
3.2. Charakterisierung des Tc-Enzyms	63
3.2.1. Optimale Reaktionsbedingungen	63
3.2.2. Molekulargewichtsbestimmung	65
3.2.2.1. Sephadex G-150 Gel-Filtration	65
3.2.2.2. SDS-Elektrophorese	66
3.2.2.3. Gradienten-Gel-Elektrophorese	68
3.2.2.4. Zusammenfassung	69
3.2.3. Isoelektrischer Punkt	69
3.2.4. Michaelis-Konstante für BAPA	69
3.2.5. Proteolytische Aktivität	70
3.2.5.1. Mit BAPA als Substrat	70
3.2.5.2. Mit Casein als Substrat	71
3.2.5.3. Mit Hämoglobin als Substrat	72
3.2.5.4. Mit Fibrinogen als Substrat	72
3.2.6. Esterase-Aktivität	73
3.2.7. Transamidase-Aktivität	73
3.2.8. Hemmung des Tc-Enzyms	73
3.2.8.1. Produkt-Hemmung	73
3.2.8.2. Blockierung der SH-Gruppe	74
3.2.8.3. Hemmung durch bivalente Schwermetalle	75
3.2.8.4. Hemmung durch organische Quecksilberverbindungen	75
3.2.8.5. Hemmung durch Trypsin-Inhibitoren	76
3.2.8.6. Zusammenfassung	78
3.2.9. Sauerstoffeinfluss	78

3.2.9.1. Hemmung	78
3.2.9.2. Schutz einer SH-Verbindung	79
3.2.9.3. Reversibilität des Sauerstoffeinflusses	79
3.2.9.4. Einfluss von SH-Reagentien während der Sauerstoffbehandlung	79
3.3. Chemische Zusammensetzung des Tc-Enzyms	80
3.3.1. Aminosäure-Zusammensetzung	80
3.3.2. Kohlehydrat-Bestimmung	81
3.3.2.1. Reduktionswert nach Park-Johnson	81
3.3.2.2. Chromatographische Bestimmung	82
3.4. Spezifität des Tc-Enzyms	83
3.4.1. Spaltung niedermolekularer Substrate	83
3.4.1.1. Spaltung von Aminosäure-p-nitroaniliden	83
3.4.1.2. Spaltung von Tryptophan-naphtylamid	84
3.4.2. Spaltung von Oligopeptiden	84
3.4.3. Fingerprint	85
3.5. Immunologische Charakterisierung des Tc-Enzyms	87
3.5.1. Reaktion mit verschiedenen Anti - <u>T. cruzi</u> - Seren	87
3.5.1.1. Anti - <u>T. cruzi</u> - Ziegen-Serum	87
3.5.1.2. Anti - <u>T. cruzi</u> - Kaninchen-Serum	89
3.5.1.3. Serum von Chagas-Patienten	90
3.5.1.4. Anti - Tc-Enzym - Serum (Kaninchen)	91
3.5.2. Aktiver Mäuse-Schutzversuch	93
3.5.3. Versuche mit permanenten Zellkulturen	93
3.5.3.1. Eindringung von <u>T. cruzi</u> (Stamm Brasil) in HeLa-Zellkulturen	93
3.6. Vergleich mit analog gewonnenen Proteasen anderer Flagellaten	98
3.6.1. Proteolytische Aktivität	98
3.6.2. Molekulargewichtsbestimmung	99
3.6.3. Immunologische Kreuz-Reaktionen	99

4. Diskussion	102
4.1. Fragestellung	102
4.2. Isolierung und Reinigung der Tc-Protease	103
4.3. Proteinchemische und kinetische Untersuchungen	105
4.3.1. Spezifität der Tc-Protease	105
4.3.2. Frage nach dem aktiven Zentrum	107
4.3.3. Chemische Zusammensetzung der Tc-Protease	115
4.4. Immunologische Untersuchungen	116
4.4.1. Einfluss verschiedener Antiseren auf die Tc-Protease	116
4.4.2. Untersuchungen von Proteasen anderer Flagellaten	119
4.4.3. Versuche mit infektiösen <u>T. cruzi</u> (Stamm Brasil)	122
4.4.4. Untersuchungen zur biologischen Funktion der Tc-Protease	123
5. Zusammenfassung	125
Literaturverzeichnis	127

Abkürzungen

BAPA = N- α -Benzoyl-D,L-Arginin-p-nitroanilid

PA = p-nitroanilid

BAEE = N- α -Benzoyl-L-Arginin-äthylester

BAA = N- α -Benzoyl-L-Argininamid

BSA = Bovines Serum Albumin

Tris = Tris-(-hydroxymethyl)-aminomethan

DTT = Dithiothreitol

TLCK = N- α -Tosyl-L-Lysyl-chloromethylketon

PMSF = Phenylmethansulfonylfluorid

NEM = N-äthyl-maleinimid

pCMB = p-Chloromercuribenzoat

SDS = Natrium Dodecylsulfat (= Duponol)

Ac = Acrylamid

MbAc = Methylenbisacrylamid

AP = Ammoniumpersulfat

DMAPN = Dimethylaminopropionitril

Temed = Tetramethylenäthyldiamin

EDTA = Äthylendiamintetraacetat

IHA = Indirekte Hämagglutination

TU = Trypsin Unit

Tc-Enzym = Trypanosoma cruzi - Enzym

1. Einleitung

Der brasilianische Arzt Dr. Carlos Chagas entdeckte 1909 in Lassance (Minas Gerais, Brasilien) im Darm blutsaugender Raubwanzen ein Trypanosom, das er Schisotrypanum cruzi (in der Systematik heute : Trypanosoma cruzi) nannte^{1, 2}.

Diese Raubwanzen (Fam. Reduviidae, Unterfam. Triatominae) - Abb. 1 - leben in verschiedenen Schlupfwinkeln (z.B. Spalten primitiver Lehmhütten, Tierställen, Vogelnestern und Erdhöhlen von Wirbeltieren) bestimmter Regionen des Süd- und Mittelamerikanischen Kontinents - Abb. 2. Der Wanzenbefall in solchen primitiven Lehmhütten kann mehrere Tausend Exemplare betragen, mit einem je nach Region verschiedenem Infektionsindex, der bis zu 100 % erreichen kann.



Abb. 1. Der Überträger der Chagas-Krankheit, die Raubwanze (*Triatoma infestans*)



Abb. 2. Geographische Verbreitung der T. cruzi - Infektion bei Insekten (Triatomen)

Die Raubwanzen verlassen ihre Schlupfwinkel nachts zur Blutaufnahme, wobei sie auch kurze Strecken fliegen können. Sie stechen den Menschen bevorzugt an unbedeckten Körperstellen (Gesicht, Arme und Beine), weswegen sie auch den

Namen "Kissing bug" tragen. Bei einem Saugakt nehmen sie bis zu 0,5 ml Blut auf und setzen unmittelbar danach ihren dünnflüssigen Kot ab, in dem sich die infektiösen Trypanosomen befinden - Abb. 3. Durch die spontane Reaktion des Menschen, sich an der Stichstelle zu kratzen, werden die Trypanosomen passiv in die Stichstelle, bestehende Hautwunden oder in die Schleimhäute (Bindehautsack) einge-
rieben.

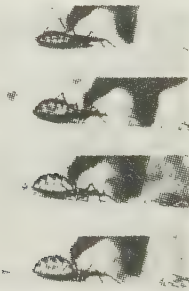
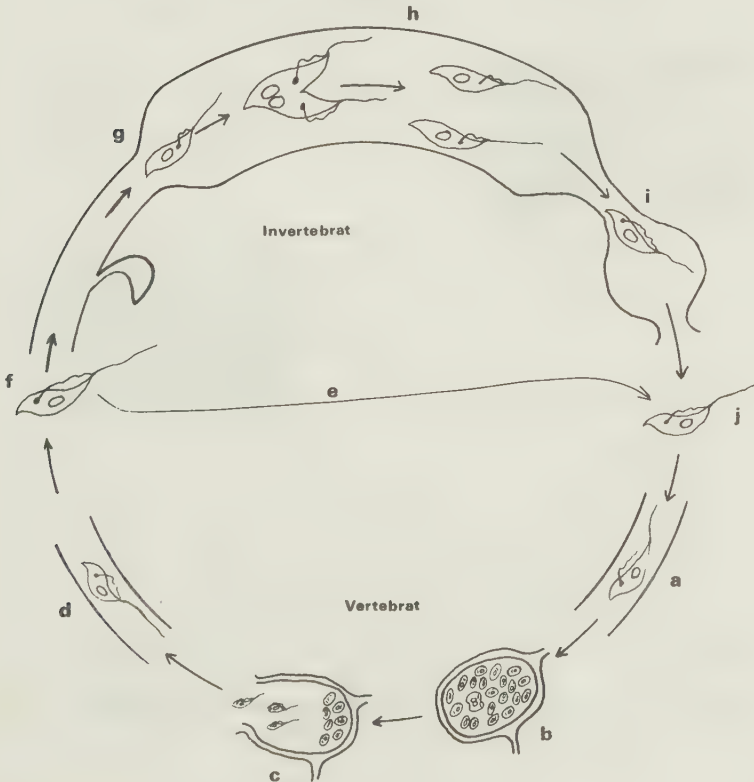


Abb. 3. Raubwanze bei der Blutmahlzeit und nachfolgender Kotablage.

Die so übertragenen infektiösen trypomastigoten Trypanosomen verbleiben auf unbestimmte Zeit in der Blutzirkulation (siehe Abb. 4 a), um dann in Gewebezellen aller Art einzudringen (Abb. 4 b). Dort verwandeln sie sich in amastigote Formen, die sich durch binäre Teilung lebhaft vermehren. Nach ca. 5 Tagen verwandeln sich die amastigoten Formen erneut in trypomastigote Formen (Abb. 4 c) die durch Platzen der Zelle wieder in die Blutbahn kommen (Abb 4 d). Nach unbestimmter Zeit wiederholt sich der Zyklus durch erneutes Eindringen der trypomastigoten Formen in eine Zelle (Abb. 4 e). Die im Blut zirkulierenden Trypanosomen können bei einer Blutmahlzeit der Raubwanze

aufgenommen werden (Abb. 4 f). Im Mitteldarm der Raubwanze verwandeln sich die trypomastigoten Blutformen in epimastigote Formen (Abb. 4 g), welche sich ebenfalls durch binäre Teilung vermehren (Abb. 4 h). Auf dem Weg zum Enddarm der Raubwanze verwandeln sich die nicht infektiösen epimastigoten Formen in infektiöse trypomastigote Formen (Abb. 4 i) die beim nächsten Saugakt der Raubwanze auf der menschlichen Haut abgesetzt werden (Abb 4 j).

Abb. 4. Schematische Darstellung des Entwicklungszyklus von T. cruzi.



Die Trypanosomen können neben der oben beschriebenen normalen natürlichen Weise seltener auch mit Hilfe der Muttermilch³, Diaplacentar⁴ oder durch Bluttransfusionen⁵ übertragen werden.

Trypanosoma cruzi tritt somit in drei verschiedenen Formen auf :

a) Trypomastigote Form (= Blutform)

Infektiöse, metacyclische Form, ca. $2 \times 20 \mu$ gross, mit zentral gelegenem Zellkern, besonders grossem, nahe dem spornförmigen Hinterende situiertem Blepharoblasten, undulierender Membran und Geissel - Abb. 5 a und 5 b. Die Trypanosomen können sich in dieser Form nicht vermehren.

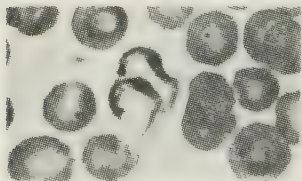


Abb. 5 a. T. cruzi - Trypomastigote Form



Abb. 5 b. Schematische Darstellung der Trypomastigoten Form.

b) Amastigote Form (= Leishmania Form)

Intrazelluläre Vermehrungsform im Säugetier und in Zellkulturen, ca. $1,5 \times 4 \mu$ gross, oval, mit rundem Kern und stäbchenförmigen, quer zur Längsachse gelegenem Blepharoblasten - Abb. 6 a und 6 b.

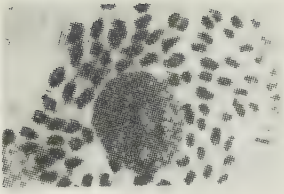


Abb. 6 a. T. cruzi - Amastigote Form.

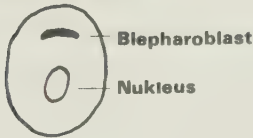


Abb. 6 b. Schematische Darstellung der amastigoten Form.

c) Epimastigote Form (= Crithidia Form)

Nicht infektiöse Vermehrungsform in der Raubwanze und in Kulturmedien, ähnlich der trypomastigoten Form, jedoch mit dem Blepharoplasten am vorderen Ende (= Geißel-Ende) - Abb. 7 a und 7 b.

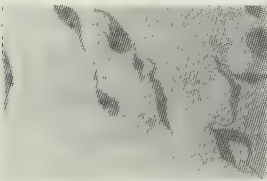


Abb. 7 a. T. cruzi - Epimastigote Form.

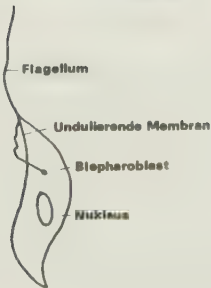


Abb. 7 b. Schematische Darstellung der epimastigoten Form.

Die Trypanosomen dringen im Endwirt (z.B. Mensch) in Zellen aller Art ein, hauptsächlich jedoch in Zellen der glatten Muskulatur von Hohlorganen (Herz, Magen, Darm, Speiseröhre).

Nach einer Inkubationszeit, die zwischen 4 Tagen und 4 Wochen schwankt, tritt das akute Stadium der Krankheit ein, wobei Ödeme und Fieber festgestellt werden können, aber auch Bronchopneumonien, gastrointestinale Symptome, meningitische und enzephalitische Erscheinungen werden hin und wieder gesehen. Während dieser Zeit können die Trypanosomen leicht im Blut der Kranken gefunden werden (Blutstropfen, Xeno-diagnose).

Nur in seltenen Fällen z.B. bei Kleinkindern kann die akute Infektion tödlich enden. In der überwiegenden Mehrzahl der Fälle geht die Krankheit in das chronische Stadium über, in dem dann Myocardiopathien im Vordergrund stehen. Es werden jedoch auch andere Krankheitsbilder wie Myxödem, Meningitis, Enzephalitis, vor allem aber die sogenannten "Megas" (Cardiomegalia, Megacolon, Megaösophagus) beschrieben. In dieser chronischen Phase werden serologische Untersuchungen (Indirekte Hämagglutination, Komplement-Bindungs-Reaktion, Latex-Test, usw.) zur Diagnose verwendet.

Eine Spontanheilung ist unbekannt⁶. Die Entwicklung von Chemotherapeutika hat in der letzten Zeit gute Resultate gebracht (z.B. Lampit von Bayer). Diese Chemotherapeutika sind äusserst wirksam in der Bekämpfung der Trypanosomen und, wenn die Infektion früh genug erkannt und therapiert wird, kann das Auftreten des Chagas-Leidens wahrscheinlich verhindert werden⁷. Zur Chemoprophylaxe sind

diese Substanzen auf Grund ihrer Toxizität jedoch nicht geeignet.

Schon seit 1913, also kurz nach der ersten Beschreibung der Chagas-Krankheit, wurden Versuche durchgeführt, eine Vaccine gegen eine T. cruzi - Infektion zu entwickeln (siehe Tabelle 1). Keine dieser Bemühungen führte jedoch bisher zu einer praktisch verwendbaren Schutzimpfung für den Menschen.

Tabelle 1. Übersicht über wesentliche Arbeiten auf dem Gebiet der Impfstoffentwicklung.

Versuchs-Art	Autor	Jahr	Lit.
Schutz mit "avirulenten" Stämmen	Brumpt	1913	8
	Goble	1951	9
	Kagan	1960	10
	Menezes	1968	11
	Marsden	1969	12
Serum immuner Tiere	Meyer	1914	13
Totimpfstoff	Muniz	1946	14
	Hauschka	1950	15
	Kagan	1961	16
	Seneca	1966	17
	Goble	1967	18
	Kierszenbaum	1975	19
Mit Röntgenstrahlen attenuierte Trypanosomen	Emmet	1950	20
	Hanson	1973	21
Mit Actinomycin D behandelte Trypanosomen	Fernandes	1965	22
	"	1966	23

Neben dem Bau verputzter Wohnungen ist die Bekämpfung des Überträgers, der Raubwanzen, mit Insekticiden vorläufig die einzig praktisch anwendbare Möglichkeit zur Bekämpfung der Chagas-Krankheit. Die Zahl der Infektions-

gefährdeten wird von der Weltgesundheitsorganisation (1974) auf 35 Millionen, die Zahl der chronisch-Kranken auf 9 Millionen geschätzt.

Da die pathologischen Veränderungen im Wirt (z.B. Mensch) möglicherweise eng mit der ausschliesslich intrazellulären Vermehrung verbunden ist, ist das Eindringen der Trypanosomen in die "Wirtszelle" ein - vielleicht der - entscheidende Angriffspunkt für eine prophylaktische Bekämpfung der Infektion. Biochemische und immunologische Arbeiten zu diesem Thema liegen meines Wissens bisher jedoch nicht vor.

Lebende Erreger können auf zwei Arten in die Zelle gelangen - passiv oder aktiv.:

- a) Passiv durch Phagozytose, von Zellen die eine solche Aktivität aufweisen, wie Granulozyten und Makrophagen, oder durch Pinozytose (wie z.B. bei sehr kleinen Erregern).
- b) Aktiv durch mechanische Bewegung und/oder mittels enzymatischer Aktivität (z.B. bei *Bdellovibrio*)²⁴.

Nach H. Meyer et al., 1958²⁵, Köberle, 1972²⁶ und Dvorak et al., 1973²⁷ dringt T. cruzi aktiv in die Zelle ein; Dvorak zeigte eine kornenzieherartige Bewegung des Trypanosoms, das sich mit dem spornförmigen Hinterende der Zelle zuwendet - Abb. 8; Köberle stellte folgende Hypothese auf : "Dieses Eindringen in die Wirtszelle geschieht mit dem spornförmigen Hinterende, wobei offensichtlich die Flüssigkeit in der Vakuole am Hinterende des Parasiten zur Auflockerung der Zellmembran in Aktion tritt" (Zitat - Köberle, 1972²⁶) - siehe Abb. 9.

Abb. 8. Eindringen von T. cruzi in Zellkulturen
(Dvorak et al., 1973²⁷).

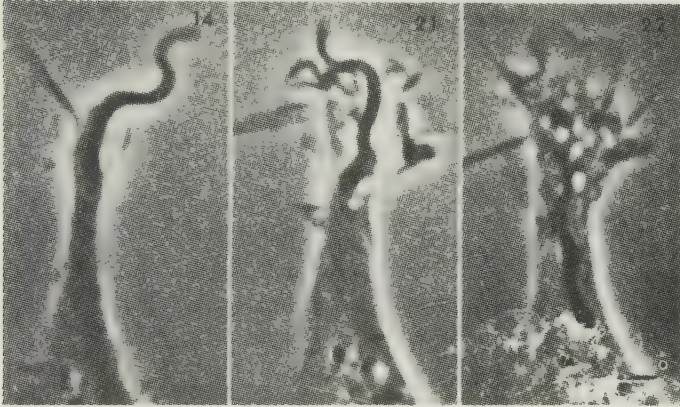
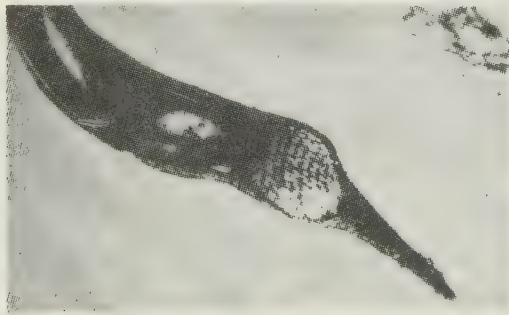


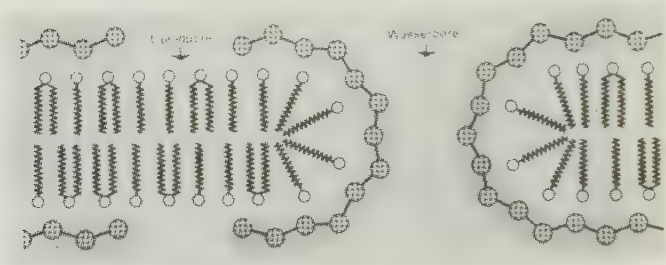
Abb. 9. Trypanosoma cruzi - elektronenoptisches Bild
(H. Meyer, 1958²⁵).



Zellmembranen (nach Untersuchungen z.B. an Erythrozyten, Amöben und Leberzellen²⁸) sind ein komplexes System, das aus Proteinen, Proteiden (Glyko- und Lipoproteide) und Lipiden aufgebaut ist. Dawson und Danielli veröffentlichten 1936 folgendes Modell : die Zellmembran besteht aus einer bimolekularen Phosphatidschicht, bei der die hydrophoben Pole sich gegenüber stehen und die hydrophilen von Proteinen

überzogen sind - Abb. 10.

Abb. 10. Schematische Darstellung der Zellmembran
(Dawson und Danielli²⁸)



Elektronenoptische Untersuchungen an künstlichen Phosphatidmembranen mit und ohne Anlagerung von Proteinen haben diese Theorie stark untermauert²⁸.

Unter Berücksichtigung der beschriebenen Membranstruktur könnte man postulieren, dass die von Köberle²⁶ genannte Flüssigkeit, die (seiner Theorie nach) von den Trypanosomen zur Auflockerung der Zellmembran verwendet wird, eine Komponente enzymatischer Natur enthält - möglicherweise eine Protease und/oder Lipase.

Das Auftreten einer Protease beim Eindringen in eine Zelle wurde z.B. bei Bdellovibrio bacteriovorus festgestellt (1965²⁹, 1971³⁰). Bdellovibrio dringt in die Wirtsbakterie ein, indem es sich zunächst unspezifisch auf deren Oberfläche festsetzt, um dann durch scheinbar "korkenzieherartige" Bewegung, die durch die Aktion verschiedener Enzyme (darunter eine Protease) unterstützt wird, einzudringen.

Diese Enzyme können nicht im Kulturmedium bestimmt werden, sie werden anscheinend erst bei dem physischen Kontakt zwischen *Bdellovibrio* und Wirtbakterie freigegeben. Ähnlich ist auch Auftreten und Funktion von Lysozym - ein Murein spaltendes Enzym - beim Eindringen von Bakteriophagen in Bakterien zu werten.

Auch das Auftreten (und die Anreicherung) einer Protease von *Schistosoma mansoni*, die anscheinend im Zusammenhang mit dem Eindringen der Cercarien in die Subcutis steht, wurde beschrieben (1956³², 1972³³, 1973³⁴).

Ein anderes Beispiel für die Funktion von Proteasen beim Eindringen einer lebender Zelle in eine andere ist das Spermatozoid. Es dringt in das Oovum mit Hilfe dreier hydrolytischer Enzyme ein. Diese Enzyme sind eine Hyaluronidase, ein "corona penetrating enzyme " und eine Protease, Acrosin.

Allgemein fasst T. von Brand den derzeitigen Wissensstand über das Auftreten und die Funktion von Parasiten-Proteasen in seinem Buch "Biochemistry of Parasites"³⁶ folgendermassen zusammen :

- a) Proteasen können zur extrakorporalen Verdauung dienen
- b) Proteasen sind eine Hilfe bei der Wanderung durch das Gewebe
- c) Proteasen unterstützen das Eindringen in eine Zelle.

Die Existenz einer Protease wurde bei Untersuchungen der metabolischen Enzyme von T. cruzi von Gonçalves et al., 1958³⁷, und, unabhängig davon, von Hungerer, 1970 (unveröffentlicht) und Itow und Camargo, 1975³⁸ gefunden. Es wurde jedoch nur das Vorhandensein einer Protease im Trypanosoma-Homogenat festgestellt. Weder eine Isolierung,

noch eine biochemische oder immunologische Beschreibung der Protease sind bisher veröffentlicht. Dementsprechend liegen auch keine Versuche oder Spekulationen über mögliche Bedeutung oder Funktion dieser Protease vor.

Wenn die Trypanosomen, ähnlich wie in den oben beschriebenen Fällen, eine Protease zum Eindringen in die Zelle verwenden, könnte man von ihr folgende Eigenschaften erwarten :

- a) Sie dürfte im Kulturmedium nicht oder nur in geringem Masse nachweisbar sein
- b) Sie müsste eine hohe Umsatzrate haben
- c) Sie dürfte nur in kleinen Mengen vorkommen (vielleicht hauptsächlich als Proenzym)
- d) Sie müsste nach ausgeübter Wirkung schnell ihre Aktivität verlieren (Labilität)
- e) Sie dürfte durch die im normalen Serum vorkommenden Protease-Inhibitoren nicht gehemmt werden
- f) Sie dürfte durch das Serum von Chagas-Patienten nicht oder nur bedingt gehemmt werden.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit :

- a) Der Isolierung dieser Protease aus dem Trypanosoma-Homogenat
- b) Der chemischen und biochemischen Charakterisierung der isolierten Protease
- c) Der immunologischen Charakterisierung der Protease
- d) Dem Versuch, die Hypothese zur Funktion der Protease zu bestätigen.

2. Material und Methoden

2.1. Geräte

Spektralphotometer

Fa. Zeiss, Modell PM 2 DL

Ultra-Schall

Branson Sonic Power Company
Modell Sonifier B-12

Ultra-Turrax

Fa. Janke und Kunkel KG
Modell TP 1B / 2

pH-Stat

Fa. Radiometer, Copenhagen
pH-Meter Modell M 62
Titrator Modell TTT 60
Servograph Modell REC 61
Autoburette Modell ABU 12

Aminosäuren-Analysator

Flüssigkeitschromatograph Multicrom B
Trennharze M 71 und M 82
Fa. Beckmann

Säulen Fraktionierung

Uvicord Control Unit (Instrument Group 8300)
Detector Unit Modell 8303 (Ultraviolet Absortio-
meter
Ultrorac Fraction Collector (Instrument Group
7000)
Fa. LKB Schweden

Lyophilisator

Modell GT 2-06
Fa. Leybold-Heraeus

Homogenisator

Fa. Braun-Melsungen

Zentrifuge

Sorvall-Zentrifuge (Sorvall Superspeed)
Modell RC 2-B
Rotor GSA, Rotor SS-34

Ultrazentrifuge
Modell L 5-50
Fa. Beckmann

pH-Meter
Modell pH 71
Fa. Knick, Berlin

Thermostat
Modell W 350 r
Fa. Memmert, Schwalbach

Waage
Feinwaage Typ 2474
Fa. Sartorius

Elektrophorese
Dünnschichtelektrophorese - Fa. Neuberger
Immunelektrophorese - Fa. Kyoritsu
Disk-Elektrophorese - Fa. Buchler Instruments

Amicon-Filter
Modell Ultrafiltrationszelle 52
Modell Ultrafiltrationszelle 2000

Mikroskop
Typ Universal, mit Projektionsaufsatz
Fa. Zeiss

2.2. Chemikalien, Material

Fa. Merck

N-Acetyl-Tyrosin-PA, L-Alanin-PA, L-Cystein-Bis-PA,
L-Glutamin-1-PA, L-Glutamin-5-PA, Glycin-PA, L-Leu-
cin-PA, L-Lysin-PA, L-Phenylalanin-PA, L-Prolin-PA,
N-Benzoyl-D,L-Lysin-PA, BAEE, PMSF, Mercaptoätha-
nol.

DC-Cellulose-Platten (0,5 mm)

Fa. Serva

BAPA, BAA, pCMB, L-Tryptophan-naphtylamid, Hämoglo-
bin vom Rind, Lysozym, NEM, MbAc, Duponol (= SDS),
Trypsin.

Alle genannten Oligopeptide

Dialyse-Schläuche " Visking "

Fa. Sigma

α -N-Benzoyl-D,L-Arginin

Fa. Boehringer Mannheim

Papain (Kristall Suspension, 10 mg / ml)

Calbiochem

DTT (Cleland's Reagent)

Cyclo Chemical

TLCK

Fa. LKB Instruments GmbH, Gräfeling.

Ampholine PAG-Platten

Carl, Schleicher und Schüll

Selecta Faltenfilter

Behringwerke Marburg

Fibrinogen von Rind, Casein, IHA-Reagentien,

Latex-Reagentien, HeLa-Zellkulturen

Alle ungenannten Substanzen waren pA Reagentien von
Merck.

2.3. Züchtung der Trypanosoma cruzi

Das Enzym wurde aus Trypanosoma cruzi, Kulturform D₁ der Fa. Behring isoliert. Es handelt sich um einen Stamm, der 1932 von einem Chagas-Patienten in Brasilien isoliert, durch die Fa. Hoechst nach Frankfurt transferiert, dort durch Mäusepassagen gehalten und seit 1959 bei der Fa. Behring auf Blutagar³⁹ passagiert wurde.

Die Trypanosomen wurden in 20 l Glassfermentern bei 28°C in einem monophasischen Medium gezüchtet, das im Wesentlichen aus Pflanzenextrakten bestand. Als Startinokulum wurden Trypanosomen verwendet, die auf biphasischem Blutagar gezüchtet waren ($1,5 \times 10^6$ Trypanosomen / ml). Nach 5 Tagen wurde durchschnittlich eine Dichte von etwa 2×10^7 Trypanosomen / ml erreicht.

2.4. Analytische Methoden

2.4.1. Bestimmung der proteolytischen Aktivität

2.4.1.1. Mit BAPA als Substrat

Die Spaltung von BAPA wurde nach der Methode von Erlanger⁴⁰ bestimmt.

Lösungen :

- a) Substratlösung - 1 mM BAPA
43,5 mg BAPA in 1 ml Dimethylsulfoxyd lösen, mit auf 25°C vorgewärmten Puffer auf 100 ml auffüllen.
- b) Standardlösung - 0,025 % Trypsin
in 0,001 N HCl lösen.
- c) Puffer - Universalpuffer nach Davies⁴¹, pH 8,5
Stammlösung - 21,01 g Citronensäure
13,61 g KH_2PO_4
19,07 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$
12,11 g Tris
7,46 g KCl
in 1 l dest. Wasser
Lösung X - 0,4 N NaOH
bei pH 8,5 : 38 ml Lösung X + 50 ml
Stammlösung, auf 200 ml mit H_2O

- d) Essigsäure 30 %

Ansatz :

Eichkurve
0,05 ml Trypsinlösung (b) mit dest. Wasser auf 1 ml auffüllen. 5 ml der auf 40°C vorgewärmten Substratlösung hinzufügen. Nach jeweils 10, 20 + 30 Min. Inkubation bei 40°C, 1 ml Essigsäure (d) hinzufügen und die Extinktion bei 405 nm messen.

Die Aktivität (angegeben in TU) wird folgendermassen berechnet :

$1 \text{ TU}_{\text{BAPA}} =$ Die Extinktion, die 10 µg Trypsin innerhalb von 20 Min. (nach Abzug des Nullwertes) unter den oben angegebenen Reaktionsbedingungen erzielt.

2.4.1.2. Mit Casein als Substrat

Die Spaltung von Casein wurde nach der Methode von Johnson⁴² bestimmt.

Lösungen :

- a) Substratlösung - 1,4 % Casein
in Tris-Puffer pH 7,5
- b) Standardlösung - 0,025 % Trypsin
in 0,001 N HCl
- c) Puffer - 0,06 M Tris
0,09 M NaCl
mit HCl auf pH 7,5 eingestellt
- d) 0,5 M HClO_4

Ansatz :

Eichkurve

0,005; 0,01; 0,015; 0,02 und 0,025 ml der Standardlösung wurden mit Tris-Puffer auf 2,5 ml aufgefüllt. 2,5 ml der auf 37°C vorgewärmten Substratlösung wurden hinzugefügt und die Mischung 30 Min. bei 37°C inkubiert. Danach wurden jeweils 3 ml des Inkubationsvolumens in 2 ml Perchlorsäure pipettiert. Die Suspensionen wurden ca. 30 Min. bei Raumtemperatur stehen gelassen. Das Sediment wurde durch Zentrifugation (20 Min. / 3200 x g) abgetrennt und wenn nötig durch Filtration geklärt. Die Extinktion der Lösungen wurde bei 275 nm gemessen.

$1 \text{ TU}_{\text{Casein}}$ = Die Extinktion, die 1 μg Trypsin innerhalb von 30 Min. (Nach Abzug des Nullwertes) unter den oben angegebenen Reaktionsbedingungen erzielt.

2.4.1.3. Mit Hämoglobin als Substrat

Die Spaltung von Hämoglobin wurde nach der Methode von Anson⁴³ bestimmt.

Lösungen :

- a) Substratlösung - 2,0 g Hämoglobin wurden mit ca. 50 ml H_2O aufgeschwemmt, 36 g Harnstoff und 8 ml 1 N

NaOH wurden hinzugefügt. Die Suspensionen wurden zur Denaturierung des Hämoglobins 1 Std. bei Raumtemperatur stehen gelassen und 10 ml 1 M Borsäure zugefügt. Durch mechanisches Rühren wurde die Suspension homogenisiert und 4,4 ml 5 % CaCl_2 wurden hinzugefügt. Mit 1 N HCl wurde der pH auf 7,5 eingestellt und die Suspension zentrifugiert (20 Min. 3200 x g).

b) Standardlösung - 0,025 % Trypsin
in 0,001 N HCl

c) 4 g NaOH
20 g $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$
in 1 l dest. Wasser lösen

d) 0,5 % $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$

e) 10 ml (c) + 0,2 ml (d)

f) Phenolreagenz nach Folin-Ciocalteu
1 : 3 mit dest. Wasser verdünnt

Ansatz :

Eichkurve

0,02; 0,04; 0,06; 0,08 und 0,1 ml der Standardlösung wurden mit dest. Wasser auf 1 ml aufgefüllt. 1 ml Substratlösung wurden hinzugefügt und die Lösungen 20 Min. bei 37°C inkubiert. 2 ml 5 %ige Trichloressigsäure wurden hinzugefügt und die Suspensionen ca. 20 Min. bei Raumtemperatur gehalten. Das Sediment wurde durch Zentrifugation abgetrennt (20 Min. / 3200 x g). Jeweils 1 ml der Überstände wurden in 2 ml 0,5 N NaOH pipettiert. 0,5 ml der Lösung (f) wurden hinzugefügt und die Lösungen 15 Min. bei Raumtemperatur gehalten. Die Extinktion der Lösungen wurde bei 578 nm gemessen.

1 TU Hämoglobin = Die Extinktion, die 10 μg Trypsin innerhalb von 20 Min. (nach Abzug des Nullwertes) unter den oben genannten Bedingungen erzielt.

2.4.1.4. Mit Fibrinogen als Substrat

Die Spaltung von Fibrinogen wurde auf die gleiche Art bestimmt, wie die Spaltung von Casein (nach Johnson⁴²).

1 TU_{Fibrinogen} = Die Extinktion, die 5 µg Trypsin innerhalb von 30 Min. (nach Abzug des Nullwertes) unter den genannten Reaktionsbedingungen (30 Min. / 37°C, 1,4 % Fibrinogen) bei 275 nm erzielt.

2.4.2. Bestimmung der Esterase- Aktivität

Die Esterase-Aktivität wurde nach der Methode von Parker und Smith^{44,45} bestimmt.

Lösungen :

- a) Substratlösung - 0,08 M BAEE in Wasser
- b) Standardlösung - 1 % Papain (Kristall Suspension)
- c) Aktivatoren-Gemisch - 0,05 M Cystein
0,02 M EDTA
mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt.
- d) 3 M NaCl
- e) 0,4 N NaOH

Ansatz :

Eichkurve

0,05; 0,1 und 0,2 ml der Standardlösung wurden in die temperierbare Elektrodenküvette des pH-Statens pipettiert und mit dest. Wasser auf 0,2 ml aufgefüllt. 1,4 ml (a), 0,2 ml (d) und 0,2 ml (c) wurden hinzugefügt. Die Reaktionszeit betrug 28 Min. Der Verbrauch an NaOH ist proportional der Zahl der gespaltenen Esterbindungen.

2.4.3. Bestimmung der Transamidase-Aktivität

Die Transamidase-Aktivität wurde nach G. de la Haba⁴⁶ bestimmt.

Lösungen :

- a) Substratlösung - 0,05 M BAA
in 0,04 M Veronal-Puffer, pH 7,2
- b) Standardlösung - 1 % Papain
(Kristall Suspension)
- c) 2 M Hydroxylamin
mit HCl auf pH 7,1 eingestellt
- d) 0,5 N NaOH
- e) 0,25 N Cystein
- f) 20 % Trichloressigsäure
- g) 5 % $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$
in 0,1 N HCl

Ansatz :

Eichkurve

0,01; 0,02; 0,03 und 0,04 ml der Standardlösung wurden mit dest. Wasser auf 1 ml aufgefüllt. 0,5 ml der auf 38°C vorgewärmten Substratlösung; 0,1 ml (c); 0,1 ml (e) und 0,05 ml (d) wurden hinzugefügt und die Mischung 10 Min. bei 38°C inkubiert. Danach wurden 0,6 ml der Inkubationslösung in 0,5 ml (f) pipettiert. 0,9 ml dest. Wasser und 0,5 ml (g) wurden hinzugefügt und die Extinktion der Lösungen wurde bei 550 nm gemessen.

2.4.4. Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Folin⁴⁷ bestimmt.

Lösungen :

- a) Standardlösung - 1 % BSA in Wasser
- b) 20 g $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$
4 g NaOH
0,2 g Natriumtartarat
in 1 l dest. Wasser lösen
- c) 0,5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$
in 100 ml dest. Wasser lösen
- d) 10 ml Lösung (b) + 0,2 ml Lösung (c)

- e) Reagenz nach Folin-Ciocalteus
1 : 3 mit Wasser verdünnt

Ansatz :

Eichkurve

0,002; 0,004; 0,006; 0,008 und 0,01 ml (a) wurden mit dest. Wasser auf 0,1 ml aufgefüllt. 0,75 ml (d) wurden hinzugefügt und die Mischung 20 Min. bei Raumtemperatur gehalten. 0,08 ml (e) wurden hinzugefügt, die Mischung 20 Min. bei Raumtemperatur gehalten und die Extinktion bei 546 nm gemessen.

2.4.5. Isolierungsmethoden

2.4.5.1. Sephadex Gel-Filtration

2.4.5.1.1. G-100

Säule : 48 cm Länge, 5 cm Durchmesser
Proteinbestimmung mit dem Uvicord bei 280 nm
Fraktionsvolumen : 25 ml
Puffer : 0,05 M Tris-HCl-Puffer + 5 mM Mercaptoäthanol, pH 7,5
Laufzeit : ca. 24 Std. (Raumtemperatur)
Auftragungsvolumen : ca. 20 ml
(maximal 200 mg Protein)
Aktivitätsbestimmung : im BAPA-Test
Eichsubstanzen : Blue Dextran und Veronal

2.4.5.1.2. G-200

Säule : 48 cm Länge, 5 cm Durchmesser
Proteinbestimmung mit dem Uvicord bei 280 nm
Fraktionsvolumen : 25 ml
Puffer : 0,05 M Tris-HCl-Puffer +
5 mM Mercaptoäthanol, pH 7,5
Laufzeit : ca. 24 Std. (Raumtemperatur)
Auftragungsvolumen : ca. 20 ml
(maximal 200 mg Protein)
Aktivitätsbestimmung : im BAPA-Test
Eichsubstanzen : Blue Dextran und Veronal

2.4.5.2. Ionenaustausch-Chromatographie

Ionenaustauschertyp : DEAE A-50
 Säule : 8 cm Länge, 10 cm Durchmesser
 Proteinbestimmung mit dem Uvicord bei 280 nm
 Fraktionsvolumen : 25 ml
 Puffer : 0,05 M Tris-HCl-Puffer
 + 5 mM Mercaptoäthanol, pH 7,5
 Linearer Gradient von 0 bis 1 M NaCl
 Laufzeit : ca. 20 Std. (Raumtemperatur)
 Auftragungsvolumen : ca. 50 ml
 (maximal 500 mg Protein)
 Aktivitätsbestimmung : im BAPA-Test

2.4.6. Methoden zur Bestimmung des Reinheitsgrades

2.4.6.1. Disk-Elektrophorese

Die Disk-Elektrophorese wurde nach der Methode von Maurer⁴⁸ im Polyanalyst bestimmt.

Lösungen :

- a) 30 g Ac + 0,8 g MbAc
 in 100 ml dest. Wasser
- b) 0,3 M Tris-HCl-Puffer, pH 8,9
- c) 1 % Ammoniumpersulfat
- d) 7,36 % Temed

Vorbereitung des Gel's :

3 ml (a) + 1,5 ml (b) + 0,8 ml dest. Wasser +
 0,5 ml (c) wurden gemischt und entgast (5 Min.
 bei 14 Torr), 0,2 ml (d) wurden hinzugefügt,
 die Mischung in mit Gummistopfen versehen Glas-
 röhren pipettiert und zur Polymerisation ca.
 2 Std. bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Zur Lokalisierung des Tc-Enzyms wurden folgende Methoden eingesetzt :

- I) Färbung des Gel-Zylinders mit Amido-Schwarz⁴⁹
 (1 % Amido-Schwarz in einer 45 % Äthanol +
 10 % Essigsäure enthaltenden Lösung).
- II) Zur Bestimmung der proteolytischen Aktivi-
 tät wurde das Gel in ca. 2,5 mm dicke

Scheibchen geschnitten und in vorgestanzte Löcher in Substrat-Agar Platten (Substrat : 0,5 % Casein, Fibrin oder BAPA) eingesetzt. Die Aktivität konnte durch Entstehung eines Lyse-Rings (Casein, Fibrin) oder eines Farb-Rings (BAPA) festgestellt werden.

III) Um die Übereinstimmung der Bande im gefärbten Gel mit der Lokalisierung der Aktivität zu beweisen, wurde der Gel-Zylinder der Länge nach halbiert, die eine Hälfte mit Amido-Schwarz gefärbt und die andere in Substrat-Agar eingebettet. Die proteolytische Aktivität konnte durch Entstehung des Lyse- oder Farb-Hofes lokalisiert werden.

IV) Zur genauen Lokalisierung und Prüfung der Übereinstimmung der Aktivität mit der Protein-Bande wurde der Gel-Zylinder der Länge nach halbiert, die eine Hälfte mit Amido-Schwarz gefärbt und die andere in 2 mm breite Scheibchen geschnitten, die in jeweils 1 ml Davies-Puffer aufgenommen wurden. Mit Hilfe eines Glas-Homogenisators wurde das Gel zerkleinert. Die so erhaltene Suspension wurde im BAPA-Test zur Bestimmung der proteolytischen Aktivität eingesetzt. Vor der Extinktionsmessung wurde das Gel durch Zentrifugation (10 Min. / 3200 x g) abgetrennt.

2.4.6.2. Immunelektrophorese

Die Agar-Platten wurden nach Heimburger⁵⁰ hergestellt (1,5 % Agar in 0,3 M Veronal-Puffer, pH 8,4). Die Enzymlösung wurde elektrophoretisch aufgetrennt :

Elektrophoresebedingungen :

Puffer : 0,3 M Veronal-Puffer, pH 8,4

Spannung : 80 V

Stromstärke : ca. 70 mA

Feldstärke : 6 V / cm

Elektrophoresedauer : 60 Min.

Wasserkühlung

Dann wurde in die ausgestanzte Mittelrinne der Platte das Antiserum pipettiert und die Platte 16 Std. bei 37°C inkubiert. Die fertigen Platten wurden gewaschen (ca. 16 Std. in 0,1 M NaCl-Lösung, bei Raumtemperatur) getrocknet und mit Amido-Schwarz gefärbt⁴⁹.

2.4.6.3. Bidimensionale Elektrophorese

Zuerst wurde eine 10 x 10 cm grosse Glasplatte mit 1,5 %iger Agarlösung (in 0,3 M Veronal-Puffer, pH 8,6) beschichtet. Die Enzymlösung, ca. 0,015 ml, wurde in ein ausgestanztes Loch an der kathodischen Seite der Platte eingebracht und elektrophoretisch aufgetrennt.

Elektrophoresebedingungen :

Puffer : 0,3 M Veronal-Puffer, pH 8,6
 Spannung : 300 V
 Stromstärke : ca. 45 mA
 Feldstärke : ca. 10 V / cm
 Elektrophoresedauer : 60 Min.
 Wasserkühlung

Nach Beendigung der ersten Elektrophoresestufe wurde der Gelstreifen mit der aufgetragenen Probe abgetrennt (ca. 2 cm breit) und bündig auf das untere Ende einer zweiten, 10 x 10 cm grossen Glasplatte übertragen. Auf den restlichen Teil der Platte wurde nun eine Antiserumhaltige Agarose-Mischung (4 % Antiserum) ausgegossen. Nach Erhärtung des Gels wurde erneut elektrophoresiert, wobei der Enzymhaltige Gelstreifen am kathodischen Ende der Platte lag.

Elektrophoresebedingungen :

Puffer : 0,02 M Veronal-Puffer, pH 8,6
 Spannung : 80 V
 Stromstärke : ca. 10 mA
 Feldstärke : ca. 3 V / cm
 Elektrophoresedauer : 16 Std.
 Raumtemperatur

Danach wurde die Platte wie schon vorher beschrieben gewaschen, gefärbt (siehe 2.4.6.2.).

Zur Lokalisierung der Aktivität wurden 2 identische Platten vorbereitet, die Platte wurde gefärbt (siehe 2.4.6.2.) und die andere wurde in 0,5 cm² grosse Stückchen geschnitten und nach 2.4.6.1.IV. weiterverarbeitet.

2.4.6.4. Immunodiffusion nach Ouchterlony⁴⁹

Die Platten wurden nach Heimburger⁵⁰ hergestellt. Das Antiserum wurde in das mittlere Loch pipettiert, die Enzymlösungen in die äusseren Löcher. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert und wie bei 2.4.6.2. weiterverarbeitet.

2.4.7. Methoden zur Bestimmung der physiko-chemischen Eigenschaften des Tc-Enzyms

2.4.7.1. Bestimmung der Konditionen im BAPA-Test

2.4.7.1.1. Zunächst wurde der optimale pH bestimmt, in einem Bereich von pH 3 bis pH 12 bei 20 Min. Inkubationszeit bei 25°C. Nach Bestimmung der optimalen Reaktionstemperatur wurde die Bestimmung bei 40°C wiederholt.

2.4.7.1.2. Die optimale Reaktionstemperatur wurde in einem Bereich von 4°C bis 50°C bestimmt, mit einer Inkubationszeit von 20 Min. bei pH 8,5.

2.4.7.1.3. Die Bestimmung der optimalen Reaktionszeit erfolgte bei pH 8,5 und 40°C Inkubationstemperatur, in einem Bereich von 5 bis 1200 Min.

2.4.7.2. Bestimmung des Isoelektrischen Punktes⁵²

Lösungen :

a) Fixierlösung : 17,25 g Sulfosalzylsäure
57,5 g Trichloressigsäure
in 150 ml Methanol lösen,
mit dest. Wasser auf
500 ml auffüllen.

b) Färbelösung : 0,115 g Coomassie Brilliant Blue
in 100 ml Entfärbungslös.

- c) Entfärbungslösung - 500 ml Äthanol
 160 ml Essigsäure
 auf 2 l mit dest. H₂O
- d) Stabilisierungslösung - 50 ml Glycerin
 500 ml (c)

Der isoelektrische Punkt wurde auf Ampholine^R PAG-Platten bestimmt. Die dazugehörigen Auftragestreifen wurden in die etwa 1 mg / ml Protein enthaltende Tc-Enzymlösung getaucht und auf die vorgeschriebenen Stellen der Platte gelegt und elektrophoresiert.

Elektrophoresebedingungen :

Puffer : Anode - 1 M H₃PO₄
 Kathode - 1 M NaOH
 Spannung : 200 V
 Stromstärke : 50 mA
 Elektrophoresedauer : 90 Min.
 10°C

Danach wurde die Platte fixiert (1 Std. in (a)), gefärbt (1 Min. bei 60°C in (b)), die überschüssige Farbe entfernt (wiederholtes Eintauchen in (c)) und in die Stabilisierungslösung gelegt (1 Std. in (d)). Zur Bestimmung des isoelektrischen Punktes wurde die so präparierte Platte auf die Ampholine Kontroll-Kurve gelegt.

Um die Übereinstimmung der proteolytischen Aktivität mit der Protein-Bande zu prüfen, wurde zweimal Enzymlösung aufgetragen. Das Gel wurde nach der elektrophoretischen Trennung geteilt, die eine Hälfte gefärbt⁵⁰ und die andere Hälfte wurde zur Aktivitätsbestimmung in 0,5 cm breite Streifen geschnitten und nach 2.4.6.1.IV. weiterverarbeitet.

2.4.7.3. Methoden zur Bestimmung des Molekulargewichtes

2.4.7.3.1. Sephadex Gel-Filtration

Auf einer Sephadex G-150 Superfine - Säule wurde eine Mischung von 1 ml Tc-Enzymlösung und 1 ml der Standardlösung⁵³ aufgetragen.

Säule : 98 cm Länge, 1,8 cm Durchmesser
 Proteinbestimmung mit dem Uvicord bei 280 nm
 Fraktionsvolumen : 3,5 ml
 Puffer : 0,05 M Tris-HCl-Puffer +
 5 mM Mercaptoäthanol, pH 7,5
 Laufzeit : ca. 24 Std. (Raumtemperatur)
 Aktivitätsbestimmung : im BAPA-Test
 Eichsubstanzen : Blue Dextran und Veronal

2.4.7.3.2. SDS-Elektrophorese

Lösungen :

- a) SDS-Puffer - 10 g SDS
 10 ml 30 % NaN_3
 450 ml Tris-Borat-Puffer
- b) Tris-Borat-Puffer - 1) 636 g Tris
 128,4 g Citronensäure
 in 2,3 l Wasser
 2) 51,7 g H_3BO_3
 10,9 g NaOH
 in 2 l Wasser
 Tris-Borat-Puffer = 1 l (1) + 0,8 l (2)
- c) Elektrophorese-Puffer = 1:3 verdünnte
 Boratlösung (2)
- d) 6,4 % Ammoniumpersulfat
- e) 12,52 g Ac + /,68 g MbAc
 in 100 ml dest. Wasser
- f) 6,4 % DMAPN

Herstellung des Gel's

102 ml der Lösung (e) wurden mit dest. Wasser
 auf 150 ml aufgefüllt; 1,5 ml (d) und 1,5 ml
 (f) wurden hinzugefügt, die Mischung auf eine
 15 x 30 cm grosse Glasplatte gegossen und
 zur Polymerisation bei Raumtemperatur gehal-
 ten. Das fertige Gel wurde während 24 Std.
 gegen SDS-Puffer dialysiert.

Die mit Tc-Enzymlösung getränkten Auftragestreifen
 wurden auf das kathodische Ende der Platte
 gelegt; es wurde während 4 Std. bei einer

Feldstärke von 10 V / cm elektrophoresiert. Wie bei der Bestimmung des isoelektrischen Punktes wurde die Tc-Enzymlösung zweimal aufgetragen, das Gel nach der Elektrophorese halbiert, die eine Hälfte mit Amido-Schwarz gefärbt und die andere in 0,5 cm breite Streifen geschnitten und nach 2.4.6.1.IV. weiterverarbeitet.

2.4.7.3.3. Gradienten-Gel-Elektrophorese⁵⁵

Lösungen :

- a) Stegemann-Puffer : 3,025 g Tris
3,66 g H_3BO_3
in 2,4 l dest. Wasser
pH 7,9
- b) 10 % DMAPN
- c) 10 % Ammoniumpersulfat
- d) 12,52 g Ac + 0,68 g MbAc
in 100 ml dest. Wasser

Gel-Zubereitung :

- a) Grund-Gel - 1,5 g Agar
4 ml Stegemann-Puffer
40 g Glukose
in 100 ml dest. Wasser
- b) 5 % Gel - 37,8 ml Ac / MbAc-Lösung
4 ml Stegemann-Puffer
auf 100 ml mit dest. Wasser
entgasen (5 Min. 14 Torr)
0,25 ml DMAPN
0,25 ml AP
- c) 25 % Gel - 23,7 g Ac
1,3 g MbAc
12,5 g Glukose
4 ml Stegemann-Puffer
mit dest. Wasser auf 100 ml
entgasen (5 Min. 14 Torr)
0,25 ml DMAPN
0,25 ml AP

Der Gel-Gradient wurde in der Stegemann-Appara-

tur hergestellt. Am Boden dieser Apparatur wurden 50 ml des Grund-Gel's eingefüllt. Darüber wurde ein linearer Gradient (5 bis 25 %, 50 / 50 ml, Schrägstellung 45°) aufgebaut, mit Wasser überschichtet und 2 Std. zur Polymerisierung stehengelassen. In horizontaler Lage wurden 50 ml des Überschichtungs-Gel's eingefüllt. Bei 4°C und 500 V wurde das Gel mit Stegemann-Puffer 2 Std. äquilibriert. Die Tc-Enzymlösung wurde 1 Std. bei 150 V, anschliessend 24 Std. bei 500 V elektrophoresiert. Wie bei den vorher beschriebenen Bestimmungen wurde die Tc-Enzymlösung zweimal aufgetragen und das Gel nach Beendigung der Elektrophorese nach 2.4.6.1. IV. weiterbehandelt (Streifenbreite = 0,5 cm).

2.4.7.4. Bestimmung der Michaelis-Konstante

Die Michaelis-Menten-Konstante wurde im BAPA-Test, bei pH 8,5; 20 Min. Inkubation bei 40°C , mit Substratkonzentrationen von 0,1 bis 1 mM bestimmt und nach Lineweaver und Burk ausgewertet.

2.4.8. Hemmung des Tc-Enzyms

2.4.8.1. Chemische Hemmung

Die Hemmung des Tc-Enzyms wurde im BAPA-Test untersucht. 1 ml des Tc-Enzym-Inhibitor-Gemisch's wurde jeweils 20 Min. bei 40°C vorinkubiert und dann im BAPA-Test (siehe 2.4.1.1.) die Restaktivität bestimmt.

2.4.8.2. Sauerstoffeinfluss

Zur Untersuchung des Einflusses von Sauerstoff auf die proteolytische Aktivität des Tc-Enzyms wurde während 0 bis 30 Min. reiner Sauerstoff durch die Tc-Enzym-Lösung geperlt. Das so behandelte Tc-Enzym wurde anschliessend im BAPA-Test ausgewertet.

Um den Einfluss von SH-Verbindungen während der Sauerstoffbehandlung zu untersuchen, wurde die Tc-Enzymlösung vor Beginn der Behandlung mit

Mercaptoäthanol (bzw. DTT) versetzt, in einer Konzentration von jeweils 5 mM

Zur Prüfung der Reversibilität des Sauerstoffeinflusses wurde eine von SH-haltigen Zusätzen freie Tc-Enzymlösung mit Sauerstoff behandelt, danach ein Teil des Ansatzes mit Mercaptoäthanol (bzw. DTT) versetzt, 10 bis 30 Min. bei 40°C inkubiert und jeweils die proteolytische Aktivität im BAPA-Test bestimmt.

2.4.9. Aktivierung des Tc-Enzyms

Der Einfluss von verschiedenen Substanzen auf die Aktivität des Tc-Enzyms wurde im BAPA-Test bestimmt :

Mercaptoäthanol $10^{-3} - 10^{-2}$
 DTT $10^{-3} - 10^{-2}$
 EDTA $10^{-4} - 10^{-1}$
 Ca⁺⁺ $10^{-4} - 10^{-1}$
 Mg⁺⁺ $10^{-4} - 10^{-1}$

2.4.10. Chemische Zusammensetzung des Tc-Enzyms

2.4.10.1. Aminosäure-Zusammensetzung

Die Aminosäure-Zusammensetzung wurde im Flüssigkeits-Chromatographen nach Moore⁵⁷ ausgeführt. Eine ca. 1 mg Protein / ml Tc-Enzymlösung wurde mit 6 N HCl in zugeschmolzenen Ampullen bei 110°C während 24 Std. und 72 Std. hydrolysiert und über die Trennharze M 71 und M 82 chromatographiert. 1/2 Cystin wurde als Cysteinsäure nach Oxidation des Tc-Enzyms mit Perameisensäure und nachfolgender Chromatographie bestimmt (nach Moore⁵⁸), Tryptophan wurde mit der direkten photometrischen Methode nach Edelhoch⁵⁹ bestimmt.

2.4.10.2. Kohlenhydrat-Bestimmung

2.4.10.2.1. Nach Park-Johnson⁶⁰

Lösungen :

a) 0,05 % $K_3(Fe(CN)_6)$

b) 5,3 g $Na_2CO_3 \cdot H_2O$
 0,65 g KCN

in 1 l dest. Wasser lösen

- c) 1,5 g $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$
 1,0 g Duponol
 in 1 l 0,05 N H_2SO_4
- d) 0,001 % Glukose

Ansatz :

Eichkurve

0,2; 0,4; 0,6; 0,8 und 1,0 ml der Glukoselösung wurden mit dest. Wasser auf 1 ml aufgefüllt und je 1 ml der Lösungen (a) und (b) zugegeben. Die Mischungen wurden 15 Min. in siedendem Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden 5 ml der Lösung (c) zugegeben und die Mischung 15 Min. bei Raumtemperatur gehalten. Die Extinktion der Lösungen wurde bei 690 nm gemessen.

2.4.10.2.2. Chromatographische Bestimmung

Lösungen :

- a) 1 N H_2SO_4
- b) gesättigtes $\text{Ba}(\text{OH})_2$
- c) Laufmittel : n-Butanol-Pyridin- H_2O (6:4:3)
- d) Färbelösungen nach Trevelyan⁶¹ :
- I) 20 ml Aceton
 0,1 ml gesättigtes AgNO_3
 bis zur Auflösung des Niederschlages
 tropfenweise Wasser zufügen
- II) 10 g KOH
 in 7,5 ml dest. Wasser lösen, mit
 Methanol auf 500 ml auffüllen
- III) 5 % $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

Ansatz :

- A) Hydrolyse - Zur Freisetzung der Zuckerbausteine wurde die Tc-Enzymlösung zunächst hydrolysiert : 0,5 ml Tc-Enzymlösung wurden lyophilisiert, in 0,1 ml 1 N H_2SO_4 aufgenommen und in einem zugeschmolzenen Reagenzglas 2 Std. auf

100°C erhitzt. Nach Abkühlung der Lösung wurde mit Ba(OH)_2 gerade neutralisiert. Das ausgefallene BaSO_4 wurde abzentrifugiert, der Überstand erneut lyophilisiert und in 0,015 ml dest. Wasser aufgenommen (nach B. Jann⁸²).

- b) Chromatographie - Jeweils 0,002 ml der Tc-Enzymlösung und der Eichsubstanzen (0,1 % Lösungen von Glukose, Glukosamin, Galaktose, Manose und Xylose) wurden auf DC-Cellulose-Platten aufgetragen und aufsteigend chromatographiert. Die Platten wurden getrocknet⁸¹ und nach Trevelyan⁸¹ durch Eintauchen in die Lösungen (I), (II) und (III) entwickelt.

2.4.11. Spezifität des Tc-Enzyms

2.4.11.1. Spaltung von Aminosäure-p-nitroaniliden

Die Spaltung der PA wurde nach der schon zur Spaltung⁴² von BAPA verwendeten Methode nach Erlanger (siehe 2.4.1.1.) durchgeführt (1 mM Substrat, pH 8,5; 20 Min. Inkubation bei 40°C, Messung der Extinktion bei 405 nm.

2.4.11.2. Spaltung von Tryptophan-naphtylamid

Die Spaltung von Tryptophan-naphtylamid wurde nach der Methode von Appel⁶³ bestimmt.

Lösungen :

- a) Substratlösung - 2 mM Tryptophan-naphtylamid
65,88 mg in 100 ml
HCl 0,005 N
- b) Standardlösung - 1 mM Naphtylamin
143,0 mg in 100 ml
5 % HClO_4 ⁴

- c) Puffer - 0,1 M Tris-HCl-Puffer
pH 7,4
- d) 20 % HClO_4
- e) NaNO_2 0,2 %
- f) Ammoniumsulfamat 0,5 %
- g) Chromogen 0,1 % - 100 mg N-(1-Naphtyl)äthylen.HCl in 100 ml Methanol lösen

Ansatz :

Eichkurve

0,05; 0,1; 0,5; 1,0 und 2,0 ml der 1:100 verdünnten Standardlösung mit HClO_4 auf 2 ml auffüllen, 2 ml Lösung (e) zufügen, 10 Min. bei 4°C stehenlassen, 2 ml Lösung (f) zufügen, 5 Min. stehen lassen, 4 ml Lösung (g) zufügen, 30 Min. bei 37°C im Dunkeln stehen lassen. Extinktion bei 578 nm messen.

Probe - 1 ml Substratlösung + 2 ml Probe (wenn nötig mit Puffer verdünnt) 2 Std. bei 37°C inkubieren. 1 ml Lösung (d) zufügen, 10 Min. bei 4000 x g zentrifugieren. 2 ml des Überstandes werden in ein Reagenzglas pipettiert und wie bei der Eichkurve mit NaNO_2 versetzt und weiterbehandelt.

2.4.11.3. Spaltung von Oligopeptiden

4 %ige Lösungen der Peptide wurden 1 : 1 mit Tc-Enzymlösung verdünnt und 20 Min. bei 40°C inkubiert. Die Lösungen wurden auf die kathodische Seite der DC-Cellulose-Platten aufgetragen und elektrophoresiert. Als Kontrolle wurden auch reine Peptidlösungen, Aminosäure-Lösungen und reines Tc-Enzym (24 Std. gegen fließendes Wasser dialysiert) elektrophoresiert.

Elektrophoresebedingungen :

Elektrolyt-Lösung : 2 % HCOOH
Spannung : 200 V

Stromstärke : ca. 50 mA
 Elektrophoresedauer : 90 Min.
 Wasserkühlung
 Aufgetragenes Volumen : 0,002 ml

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Platten getrocknet, mit Kollidin (10 ml Kollidin + 90 ml wassergesättigtes Butanol) und unmittelbar danach mit Ninhydrin (Sprühreagenz) besprüht und 20 Min. bei 110°C getrocknet⁸⁴.

2.4.11.4. Fingerprint⁶⁵

0,015 g reduziertes, carboxymethyliertes Lysozym wurden in 1,5 ml destiliertem Wasser in einer temperierbaren Elektrodenküvette des pH-Statens gelöst, mittels NaOH auf pH 8,0 eingestellt und 0,02 ml der Tc-Enzym-Lösung (bzw. Trypsin-Lösung) hinzugefügt. Nach 24 Std. bei 30°C wurde der pH mit Eisessig auf 4,5 eingestellt und die Suspension lyophilisiert. Der Rückstand wurde in 0,6 ml dest. Wasser aufgenommen, der Niederschlag abzentrifugiert und 0,01 ml der Lösung auf eine DC-Cellulose-Platte aufgetragen. Die Platte wurde mit Amylalkohol-Isobutanol-n-Propanol-Pyridin-H₂O (1 : 1 : 1 : 3 : 3) als Laufmittel chromatografiert. Danach wurde die getrocknete Platte senkrecht zur ersten Laufrichtung elektrohporesiert.

Elektrophoresebedingungen :

Puffer : 9,5 ml Essigsäure
 20 ml Pyridin
 mit dest. Wasser auf 1 l füllen
 pH 5,3
 Spannung : 500 V
 Stromstärke : ca. 50 mA
 Elektrophoresedauer : 60 Min.
 Wasserkühlung

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde die Platte getrocknet und mit Ninhydrin gefärbt.

2.4.12. Immunologische Charakterisierung des Tc-Enzyms

2.4.12.1. Herstellung eines spezifischen Antiserums

Zwei Kaninchen wurden mit einer Lösung hochgereinigtem Tc-Enzym immunisiert. Eine Dosis von 0,15 mg Tc-Enzym-Protein in 3 ml 0,05 % Aerosil^R wurde den Kaninchen an den Tagen 1,2,3,4,5,15,16,17,18,19,30,31,32 und 33 intravenös appliziert. Blutproben wurden an den Tagen 1 und 38 genommen. Der Titeranstieg wurde mittels Immunelektrophorese (siehe 2.4.6.2.), Immunodiffusion (siehe 2.4.6.4.), Gegenstromelektrophorese (siehe 2.4.12.1.1.), Indirekter Hämagglutination (siehe 2.4.12.1.2.) und im Latex-Test (siehe 2.4.12.1.3.) ausgewertet.

2.4.12.1.1. Gegenstromelektrophorese

Die Agar-Platten wurden nach Heimburger⁵⁰ hergestellt. Das Antiserum wurde in die auf der anodischen Seite ausgestanzten Löcher pipettiert, die Tc-Enzym-Lösung in die ca. 0,5 cm entfernten Löcher an der kathodischen Seite.

Elektrophoresebedingungen :

Puffer : 0,3 M Veronal-Puffer
pH 8,2
Spannung : 120 V
Stromstärke : 25 mA
Feldstärke : ca. 5 V / cm
Elektrophoresedauer : 60 Min.
Wasserkühlung

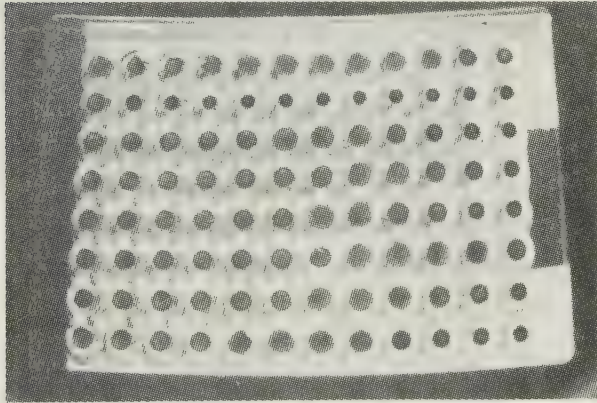
Die Platten wurden nach der bei 2.4.6.2. beschriebenen Methode getrocknet und gefärbt.

2.4.12.1.2. IHA-Test⁶⁶

Der IHA-Test wurde mit einem Chagas-Reagentien-Kit durchgeführt. In jedes Loch der Mikrotiter-Platte wurde zunächst 0,05 ml des dazugehörigen Puffers vorgetropft, dann 0,05 ml des auszuwertenden Antiserums in das erste Loch der Titrationsreihe pipettiert. Mit Hilfe der 0,05 ml

Quirle wurde das Serum verdünnt (von 1 : 2 bis 1 : 4096). 0,025 ml der resuspendierten stabilisierten sensibilisierten Erythrozyten wurden in jedes Loch getropft. Nach ca. 3 Std. bei Raumtemperatur wurden die Platten abgelesen (siehe Abb. 11).

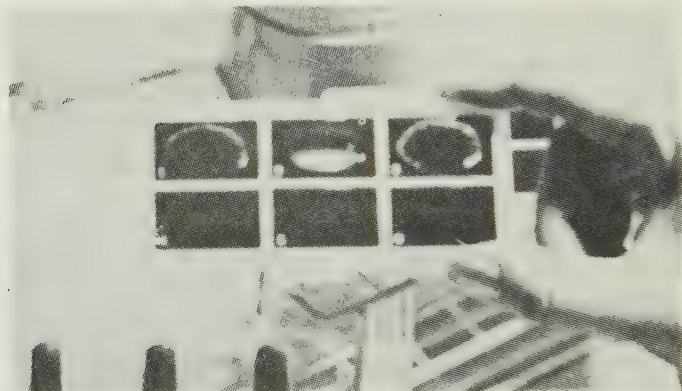
Abb. 11. Mikrotiter-Platte - Ergebnisse eines IHA-Tests.



2.4.12.1.3. Latex-Test

Der Test wurde mit dem Chagas-Latex-Reagenz durchgeführt. Es wurde eine geometrische Verdünnungsreihe des auszuwertenden Serums vorbereitet (von 1:2 bis 1:64) ; 1 Tropfen des Latex-Reagenz' wurde mit jedem Tropfen der Verdünnungen gemischt und 7 Min. leicht bewegt. Mit Hilfe einer Lupe (Vergrößerung ca. 1,5 mal) wurde die Agglutination abgelesen (siehe Abb. 12).

Abb. 12. Ausführung eines Latex-Tests.



2.4.12.2. Aktiver Mäuse-Schutzversuch

Weisse Mäuse des Inzucht-Stammes Albany ("colony breeding") wurden nach dem in Tabelle 2 angegebenen Schema immunisiert.

Zur Immunisierung der Tiere wurden die in Tabelle 3 angegebenen Substanzen verwendet. Jeweils $2\text{ }\mu\text{g}$ hochgereinigtes Tc-Enzym wurde mit den in Tabelle 3 angegebenen Adjuvantien verdünnt; pro Maus wurden $2\text{ }\mu\text{g}$ Tc-Enzym / $0,025\text{ ml}$ appliziert.

Die Gruppen 13 und 14 (siehe Tabelle 3) wurden zur Kontrolle des Immunisierungssystems der Mäuse mit je 5×10^7 lebenden Trypanosomen des Kulturstammes D_1 immunisiert.

Jede Gruppe enthielt 16 Mäuse, die an dem angegebenen Datum mit T. cruzi (Stamm Brasil) zur Kontrolle der Schutzwirkung mit einer Dosis von 5×10^5 Trypanosomen (in einem Volumen von $0,5\text{ ml}$) infiziert wurden (= Challenge).

Der Stamm Brasil ist ein virulenter T. cruzi -

Tabelle 2. Immunisierungsschema für den aktiven Mäuseschutzversuch.

Gruppe	Tag																															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	
1	Im						B									B						Bi										Ch
2	Im						B									B						B										Ch
3	Im						B									B						Ch										
4	Im						B									B						Bi										Ch
5	Im						B									B						B										Ch
6	Im						B									B						Ch										
7	Im						B									B						Bi										Ch
8	Im						B									B						B										Ch
9	Im						B									B						Ch										Ch
10	Im						B									B						Bi										Ch
11	Im						B									B						B										Ch
12	Im						B									B						Ch										
13	Im																															
14	Im																					Ch										
15																																
16																							Ch									

Im = Subkutane Immunisierung
 B = Subkutane Boosterung
 Bi = Intravenöse Boosterung
 Ch = Challenge

Tabelle 3. Substanzen zur Immunisierung der Mäuse im aktiven Schutzversuch

Gruppe	Antigen	
	sc-Appliz.	iv-Appliz.
1	Tc-Enzym + K. Freund-Adj.	Tc-Enzym + Hämaccel-Glukose
2	"	
3	"	
4	Tc-Enzym + $Al(OH)_3$	Tc-Enzym + Hämaccel-Glukose
5	"	
6	"	
7	K. Freund-Adj.	Hämaccel-Glukose
8	"	
9	"	
10	$Al(OH)_3$	Hämaccel-Glukose
11	"	
12	"	
13	<u>T. cruzi</u> (D ₁)	
14	"	

Stamm, der durch wöchentliche Passagen auf Mäusen des Stammes Albany gehalten wird. Die verwendete Infektionsdosis wurde durch Auszählen der Trypanosomen im heparinisierten Vollblut und durch dessen Verdünnung mit physiologischer NaCl-Lösung bestimmt.

Zur Titerkontrolle wurden jeweils 2 Mäuse pro Gruppe am Tag 22 und am Tag 30 entblutet und die hemmende Wirkung des Serums auf das Tc-Enzym im BAPA-Test ausgewertet. Zu diesem Zweck wurden jeweils 5, 10, 20 und 50 μ l Serum mit dem Tc-Enzym versetzt, mit Davies-Puffer auf 1 ml aufgefüllt und 20 Min. bei 40°C vorinkubiert. Die proteoly-

tische Aktivität der Lösungen wurde dann im BAPA-Test bestimmt.

Nach dem Challenge wurde die Infektion durch mikroskopische Beurteilung von nativem Blut, das aus dem Schwanz-Ende der Maus entnommen wurde, am Tag 37, 45, 50 und 64 verfolgt (die Gruppen 3, 6, 9, 12, 14 und 16, die eine Woche vor den anderen mit infektiösen Trypanosomen behandelt waren, wurden ausserdem am Tag 30 kontrolliert). Dabei wurde das Bewertungsschema der Tabelle 4 (Vergrösserung 320) angewendet.

Tabelle 4. Bewertungsschema der Mäuseinfektion

Bewertung	Befund
//+//	1 Erreger im ganzen Präparat (13 x 54 mm)
(+)	1 Erreger in jedem 2. Gesichtsfeld
+	1 - 3 Erreger in jedem Gesichtsfeld
+(+)	4 - 10 " " " "
++	10 - 20 " " " "
+++	mehr als 20 Erreger in jedem Gesichtsfeld
++++	" " 100 " " " "

2.4.12.3. Versuche mit permanenten Zellkulturen

2.4.12.3.1. Eindringen von I. cruzi in Zellkulturen^{29,68,69}

Permanente Zellkulturen der Linie HeLa wurden in Roux-Flaschen mit Eagle's Medium⁷⁰ gehalten. Nach Bildung einer dichten Monolayer wurden die Zellen mit Hilfe einer Trypsin-Lösung (5 ml Trypsin 5 % + 3 ml NaHCO₃ 5 % in 100 ml PBS) abgelöst, indem ca. 2 ml der Lösung 10 Min. bei 37°C auf die Zellen einwirkten. Danach wurde die Trypsinlösung verworfen und die Zellen mit 6 ml Eagle's Medium vollends abgelöst und in 200 ml Eagle's Medium aufgenommen. Je 3 ml dieser Suspension wurden in Leighton-Tubes pipettiert, die dünne, 13 x 54 mm

grosse Deckgläser enthielten, und die Zellen 24 Std. bei 37°C inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurde das Medium entfernt und durch frisches Medium, das die verwendete Konzentration infektiöser Trypanosomen (Stamm Brasil, siehe 2.4.12.2.) enthielt, ersetzt. Zwei Tage danach wurde das Medium mit den überschüssigen Trypanosomen verworfen, die Zellen mit Eagle's Medium gewaschen und frisches Medium eingeführt. Nach weiteren zwei Tagen wurden die Deckgläser aus den Leighton-Tubes genommen und in physiologischer NaCl-Lösung gewaschen. Die Zellkulturen wurden luftgetrocknet (bei Raumtemperatur), 5 Min. mit Methanol fixiert, nach Giemsa gefärbt und die Infektionsrate bestimmt (Vergrösserung 320).

2.4.12.3.2. Einfluss des spezifischen Anti-Tc-Enzym-Serums auf das Eindringen der Trypanosomen in die Zellkulturen

Zellkulturen wurden am Tag der Infektion mit T. cruzi (siehe 2.4.12.3.1.) mit Eagle's Medium bedeckt, das neben den Trypanosomen gleichzeitig auch das Anti-Tc-Enzym-Gamma-Globulin (Kaninchen) enthielt. Das Gamma-Globulin wurde in Konzentrationen von 1 %, 5 %, 10 % und 20 % bezüglich des Gesamtvolumens im Leighton-Tube, inklusive dem Trypanosoma-haltigen Mäuseblut, zugegeben. Als Kontrolle wurde normales Kaninchen Serum und das Gamma-Globulin normalen Kaninchen Serum's (isoliert durch Ionenaustausch-Chromatographie) verwendet. Bei einem Medium-Wechsel am Tag 3 wurde das T. cruzi- und Antikörper-enthaltende Medium verworfen. Am 5. Tag nach der Überimpfung der Zellen wurden die Deckgläser herausgenommen, getrocknet, fixiert und gefärbt (siehe 2.4.12.3.1.) und die Infektionsrate ausgezählt (Vergrösserung 320).

2.4.13. Bestimmung von Proteasen anderer Flagellaten

Die auf biphasischem Blutagar³⁹ gezüchteten Flagellaten (Crithidia fasciculata, Leptomonas pessoai und Leishmania enriettii) wurden zwei mal mit

physiologischer NaCl-Lösung gewaschen, in Davies-Puffer aufgenommen, 6 mal 30 Sek. lang mit Ultraschall behandelt (Output 10) und zentrifugiert (60 Min. 16 300 x g), parallel zur Aufarbeitung der Trypanosomen (siehe 3.1.1.).

Die proteolytische Aktivität wurde im BAPA-Test bestimmt (siehe 2.4.1.1.).

Durch Sephadex G-150 Gel-Filtration wurde das Molekulargewicht bestimmt (siehe 2.4.7.3.1.).

Immunologische Kreuzreaktionen wurden durch Immunelektrophorese (siehe 2.4.6.2.) und Immunodiffusion nach Ouchterlony (siehe 2.4.6.4.) untersucht.

3. Ergebnisse

3.1. Isolierung des Tc-Enzyms

3.1.1. Lokalisierung des Tc-Enzyms

Zunächst wurde das Kulturmedium der Trypanosomen auf proteolytische Aktivität untersucht, BAPA wurde jedoch nicht gespalten.

Durch Waschen mit physiologischer NaCl-Lösung wurden die Trypanosomen von dem Kulturmedium getrennt, durch Ultra-Schall-Behandlung (6 mal 30 Sek., Output 10) aufgeschlossen und durch Zentrifugation wurden Überstand und Sediment getrennt (60 Min. / 16 300 x g). Es zeigte sich, dass das Sediment keine proteolytische Aktivität enthielt, der Überstand jedoch BAPA spaltete (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5. Zentrifugation des Trypanosoma-Homogenats.

Zeit (Std.)	Umdrehung (x g)	Überstand		Sediment	
		TU/ml	% Aktivität	TU/ml	% Aktivität
-	-	31,0	100,0	-	-
2	16 000	29,8	96,1	0,29	0,93
2	154 000	28,4	91,6	1,37	4,42
18	154 000	15,1	48,7	13,40	43,20

Demnach handelt es sich um ein lösliches Enzym, das weder an Zellorganellen noch an die Membran gebunden ist, aber möglicherweise ein höheres Molekulargewicht besitzt.

Für die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche (sofern spezifische Angaben fehlen) wurde stets der durch Zentrifugation (60 Min. / 16 300 x g) erhaltene Überstand der Ultra-Schall-Behandlung verwendet - der sogenannte Ausgangsüberstand.

3.1.2. Ammoniumsulfat-Fällung und Dialyse

Durch Zufügen von festem Ammoniumsulfat wurde der Ausgangsüberstand auf 10 % Ammoniumsulfat eingestellt und das erhaltene Sediment abzentrifugiert. Der Überstand wurde durch erneutes Hinzufügen von Ammoniumsulfat auf 30 % eingestellt, das Sediment abzentrifugiert, der Überstand auf 50 % Ammoniumsulfat eingestellt und das Sediment abzentrifugiert. Die Sedimente wurden dialysiert (24 Std. gegen flissendes deionisiertes Wasser bei 4°C) und auf das Ausgangsvolumen aufgefüllt. Es wurden Proben von jeder Fraktion entnommen und im BAPA-Test ausgewertet (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6. Ergebnisse der Ammoniumsulfat-Fällung

% (NH ₄) ₂ SO ₄		TU Total	TU nach Dialyse	Aktivität %
-		15 090		100,00
10	Sed.		39,5	0,26
	Üb.	-		-
30	Sed.		42,7	0,28
	Üb.	-		-
50	Sed.		2726,0	18,00
	Üb.	730		4,80
Ausbeute				23,34 %

Tabelle 6 zeigt, dass das Tc-Enzym bei 50 % Ammoniumsulfat ausfällt. Im Ganzen konnten jedoch nur ca. 20 % der eingesetzten Aktivität wiedergefunden werden. Es zeigte sich, dass der Aktivitätsverlust schon allein des nicht fraktionierten Ausgangsmaterials bei 24.stündiger Dialyse gegen Tris-Puffer (4°C) 65 % betrug :

Ausgangsüberstand : 4024 TU Total

Nach der Dialyse : 1430 TU Total = 35,5 %

Um zu erkunden, ob die Tc-Protease zum Teil als kleine dialysierbare Moleküle vorliegt, wurde ein Spezial-Dialyse-Schlauch (Typ UF 5, Ausschlusslimit ca.

5 000 Dalton) eingesetzt, und 40 ml des Ausgangsüberstandes wurde gegen jeweils 200 ml Tris-Puffer unter mechanischem Rühren 24 Std. bei 4°C dialysiert (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7. Einfluss der Porengrösse des Dialyse-Schlauches auf den Aktivitätsverlust durch Dialyse

Material	5 000 Dalton Aktivität		20 000 Dalton Aktivität	
	Total	%	Total	%
Innendialysat	1226,2 TU	78,0	1147,2 TU	75,0
Aussendialysat	4,0 TU	0,4	6,1 TU	0,3
Nicht dialysierte Kontrolle : 1572,0 TU = 100 %				

Da kein nennenswerter Unterschied bei beiden Dialyse-Versuchen festzustellen war und das Tc-Enzym nicht im Aussendialysat bestimmt wurde, wurde die Möglichkeit einer Adsorption des Tc-Enzyms an den Dialyse-Schlauch erwogen. Zur Untersuchung eines solchen Effekts wurde der Tc-Enzym-Lösung zerschnittener Dialyse-Schlauch (ca. 0,5 cm² grosse Stückchen) zugefügt und die Lösung 4 Tage bei 4°C aufbewahrt. Um den Autolyse-Wert zu bestimmen wurden Tc-Enzym-Proben 4 Tage in Reagenzgläsern bei 4°C stehen gelassen. Proben wurden täglich entnommen und eingefroren. Am vierten Tag wurden die Proben im BAPA-Test ausgewertet (Tabelle 8).

Tabelle 8. Ergebnisse der Prüfung der Adsorption des Tc-Enzyms an den Dialyse-Schlauch und der Autolyse

Zeit	Autolyse-Kontrolle Aktivität		Adsorptions-Kontrolle Aktivität	
	Total	%	Total	%
Tag 1	19,3 TU	100,0	19,3 TU	100,0
Tag 2	19,3 TU	100,0	18,9 TU	97,9
Tag 3	19,3 TU	100,0	18,8 TU	97,4
Tag 4	19,0 TU	98,4	18,5 TU	96,3

Tabelle 8 zeigt, dass sowohl die Autolyse wie die Adsorption des Tc-Enzyms am Dialyseschlauch zu keinem nennenswerten Aktivitätsverlust führt. Der Aktivitätsverlust bei der Dialyse könnte auch auf einen Zerfall des Tc-Enzyms in Untereinheiten weisen. Deshalb wurde der Einfluss von Calcium und Magnesium Ionen, sowie von EDTA, auf die proteolytische Aktivität untersucht :

Tabelle 9. Einfluss von Ca^{++} und Mg^{++} sowie EDTA auf die Enzymaktivität.

Konzentration (M)	Ca^{++}		Mg^{++}		EDTA	
	Aktivität TU	%	Aktivität TU	%	Aktivität TU	%
0,1	9,4	87,8	10	93,4	9,2	85,9
0,01	8,1	75,7	10,2	95,3	10,3	96,3
0,001	9,3	86,9	10,0	93,4	9,5	88,8
0,0001	9,6	89,8	10,3	96,2	9,6	89,7
0	10,7	100,0	10,7	100,0	10,7	100,0

Die Hypothese des Zerfalls von durch Metallionen zusammengehaltenen Untereinheiten konnte somit nicht untermauert werden.

3.1.3. Sephadex G-100 Gel-Filtration

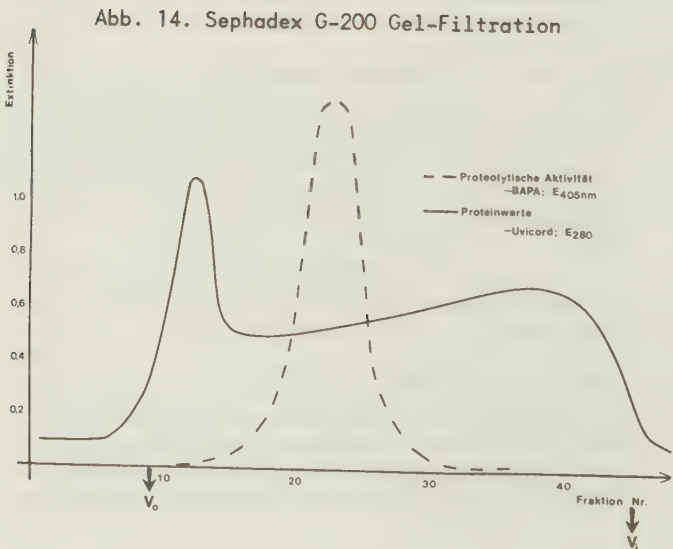
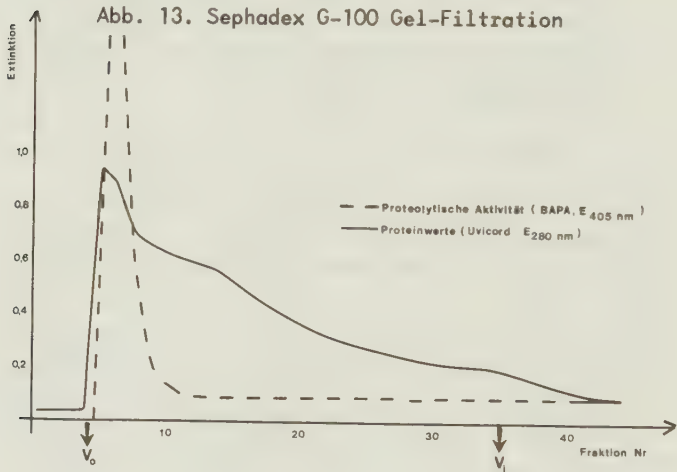
Die Fraktionierung des Ausgangsüberstandes durch eine Gel-Filtration auf einer G-100 Sephadex-Säule zeigte einen diffusen Protein-Peak (Uvicord, 280 nm). Die Aktivitätsbestimmung zeigte eine Übereinstimmung des Protein-Peak's mit dem Aktivitäts-Peak.

Das Tc-Enzym wurde nicht eingeschlossen, eine Trennung von inaktivem Material war bedeutungslos (siehe Abb. 13).

3.1.4. Sephadex G-200 Gel-Filtration

Die Fraktionierung des Ausgangsüberstandes durch eine Gel-Filtration auf einer G-200 Sephadex-Säule zeigte 2 Protein-Peaks, einer nahe dem Ausschluss- und einer nahe dem Einschlussvolumen. Der

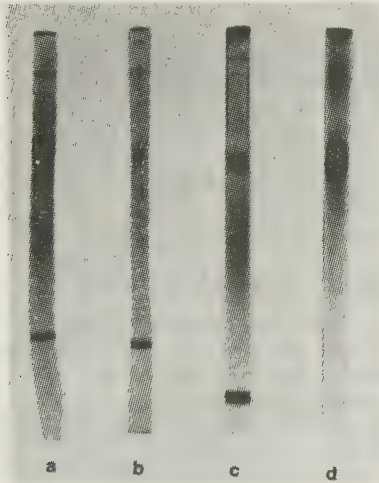
Aktivitätspeak lag zwischen den beiden Proteinpeaks, teilweise in den Peak des niedermolekularen Proteins eingeschlossen (siehe Abb. 14).



Eine Kontrolle des Reinheitsgrades durch Disk-Elektrophorese wies 3 Proteinbanden auf (Abb. 15 b).

Abb. 15. Disk-Elektrophorese der einzelnen Reinigungsschritte :

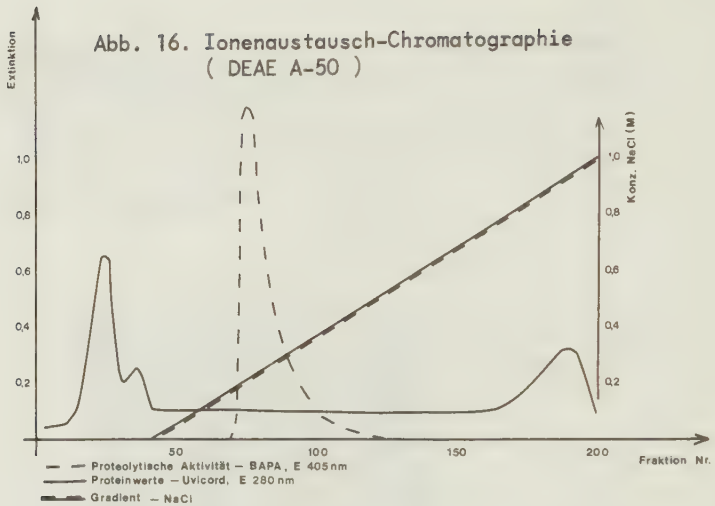
- (a) Ungereinigter Ausgangsüberstand
- (b) G-200
- (c) DEAE A-50
- (d) G-200 + DEAE A-50



3.1.5. Ionenaustausch-Chromatographie

Das Tc-Enzym wurde bei einer Fraktionierung des Ausgangsüberstandes auf einer DEAE A-50 Ionenaustausch-Säule adsorbiert. Bei der Elution mit einem linearen NaCl-Gradienten zeigten sich zwei vollkommen getrennte Proteinpeaks. Das Tc-Enzym wurde bei 0,2 bis 0,3 M NaCl eluiert. Abb. 16 zeigt, dass bei dem Aktivitätspeak besonders niedrige Proteinwerte bestimmt wurden (Uvicord, 280 nm), so dass eine sehr gute Trennung des aktiven Materials von inaktivem Material erfolgte.

Bei einer Reinheitskontrolle durch Disk-Elektrophorese zeigten sich jedoch mehrere Protein-Banden (siehe Abb. 15 c und Abb. 16).



3.1.6. Kombination beider Verfahren

Beide oben beschriebenen Verfahren wurden nun kombiniert, so dass das Tc-Enzym-Molekül sowohl durch Sephadex Gel-Filtration, i.e., durch die Grösse des Moleküls, wie auch durch Ionenaustausch-Chromatographie, i.e., durch die Ladung des Moleküls, von dem inaktiven Material getrennt werden konnte. Zu diesem Zweck wurde der Ausgangsüberstand zunächst auf eine Sephadex G-200 Säule aufgetragen, die aktiven Fraktionen gepoolt, gegen Puffer dialysiert, lyophilisiert und der Rückstand in Puffer aufgenommen. Diese Lösung wurde nun auf eine DEAE A-50 Ionenaustauscher-Säule aufgetragen, die aktiven Fraktionen gepoolt, dialysiert und lyophilisiert. Die so erhaltene Tc-Enzym-Lösung wurde nun zur Untersuchung des Reinheitsgrades elektrophoresiert (Disk-Elektrophorese, siehe 2.4.6.1.). Es zeigte sich eine einzelne Protein-Bande (siehe Abb. 15 d) die mit der Lokalisierung der Aktivität (siehe 2.4.6.1.IV.) übereinstimmte (Abb. 17). Eine Aktivitätsbestimmung nach BAPA zeigte jedoch, dass dieses Verfahren einen Aktivitätsverlust von ca. 90 % verursachte (Tabelle 10).

Abb. 17. Auswertung einer Disk-Elektrophorese.

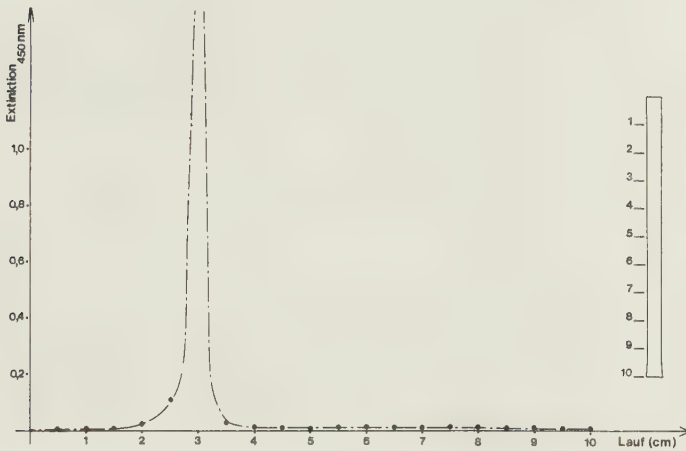


Tabelle 10. Aktivitätsverlust bei der Isolierung.

Isolierungsschritt	Aktivität	
	TU	%
Ausgangsüberstand	2325	100,0
DEAE A-50	1280	55,0
Dialyse, Lyophil.	700	30,1
G-200	380	16,3
Dialyse, Lyophil.	160	6,9

Ein Versuch, die Einengungskonditionen zu mildern, indem statt Lyophilisation Rotavaporisierung, Amicon-Filtration oder Einengung durch Kollodium-Hülsen eingesetzt wurden, zeigte keine Minderung des Aktivitätsverlustes (Tabelle 11).

Tabelle 11. Aktivitätsverlust nach verschiedenen Konzentrierungsverfahren.

Verfahren	Aktivität	
	TU	%
	195,0	100,0
Lyophilisation	79,6	40,8
Rotavaporisierung	83,3	42,7
Amicon-Filtration	91,3	46,8
Kollodium-Hülsen	76,8	39,4

Im Gegensatz zu dem in Tabelle 11 angeführten Aktivitätsverlust von jeweils ca. 60 % bei der Einengung des hochgereinigten Tc-Enzyms (Isolierung durch G-200 und DEAE A-50), zeigte eine Einengung (durch Lyophilisation, Rotavaporisierung, Amicon-Filtration oder Kollodium-Hülsen-Einengung) des unbehandelten Ausgangsüberstandes einen Aktivitätsverlust von ca. 30 % bei jedem der aufgeführten Schritte.

Ein Versuch, das Tc-Enzym durch Zugabe von Protein zu stabilisieren⁷² schlug fehl, da nach einer 24. Std. Dialyse des hochgereinigten Tc-Enzyms, mit oder ohne Zusatz von Protein, nur ca. 40 % der eingesetzten Aktivität festzustellen war :

Tabelle 12. Einfluss von Protein-Zusätzen auf die Aktivität.

Zusatz	Aktivität *	
	TU	%
	8,90	40,5
Orosemuroid	9,30	42,3
BSA	8,96	40,8
Casein-Pepton	8,46	38,5
Fleisch-Pepton	8,59	39,1

* = die Angabe in % Aktivität wurde bezüglich der Aktivität des nicht dialysierten Tc-Enzyms berechnet

Ein weiterer Versuch zur Stabilisierung des Tc-Enzyms wurde durch Zusatz von SH-reduzierenden Substanzen unternommen. Zunächst wurde Cleland's Reagent =

Dithiothreitol (= DTT⁷³) der Tc-Enzym-Lösung zugefügt. Es zeigte sich, dass ein Zusatz von nur 5 mM DTT zu einer Lösung hochgereinigtem Tc-Enzym die Aktivität der Lösung innerhalb von 48 Std. um 50 % erhöhte (Tabelle 13). Auch eine Dialyse der Tc-Enzym-Lösung gegen 5 mM DTT enthaltenden Tris-Puffer (pH 7,5) zeigte einen Aktivitätsverlust von nur 20 % :

Unbehandeltes hochgereinigtes Tc-Enzym : 25 TU
Dialysiertes (24 Std. 4°C) Tc-Enzym : 20,4 TU

Tabelle 13. Wirkung von Dithiothreitol auf die Aktivität des Tc-Enzyms.

Zusatz	Zeit (Stunden)					
	0,33		24		48	
	Aktivität TU	%	Aktivität TU	%	Aktivität TU	%
	24,5	100	24,5	100	24,2	99
+ 5 mM	27,8	114	32,6	133	36,7	150
+ 20 mM	29,4	120	34,5	141	37,7	154

Auch Mercaptoäthanol zeigte ähnliche Ergebnisse, wenn es in einer Konzentration von 5 mM einer Lösung von hochgereinigtem Tc-Enzym zugefügt wurde.

Auf Grund dieser Resultate wurde nunmehr bei der Isolierung des Tc-Enzyms durch Sephadex G-200 Gel-Filtration und DEAE A-50 Ionenaustausch-Chromatographie jeweils 5 mM Mercaptoäthanol dem Puffer (Tris-Puffer) zugefügt.

3.1.7. Beispiel einer kompletten Isolierung

Aus 3×10^{11} Trypanosomen, der Ernte eines durchschnittlichen Fermenters (20 l) nach 5 Tagen, wurden nach Ultra-Schall-Behandlung und Zentrifugation 6071 TU Total erhalten. Bei jedem einzelnen der angegebenen Schritte der Isolierung (siehe Tabelle 14) wurde jeweils ein Aliquot der respektiven Fraktion zurückbehalten und tiefgefroren (für die verschiedenen Bestimmungen : Ausbeute, Proteinbestimmung, Bestimmung des Reinheitsgrades, usw.).

Tabelle 14. Beispiel einer kompletten Isolierung.

		Verlust		Zurückgehalten		Ausbeute/ Schritt	Reale Ausbeute	Spez. Aktivität
		TU	%	TU	%	%	%	mg/ml
2,9 x 10 ¹¹ Trypanosomen 19,5 L Medium								
30 Min / 8000 x g	Sediment							
Physiol. NaCl 30 Min. 8000 x g	Sediment							
Tris - DTT - Puffer 6 x 30 Sek. Ultra-Schall 60 Min. / 16300 x g	Überstand (6071,1 TU)						100,0	13,2
	5145,0 TU			926	15,3		84,7	
DEAE-50	(5030,0 TU)	115	1,9			97,7	82,8	
	4600,0 TU			430	7,1		75,8	
Amicon UF 100	(4196,0 TU)	404	6,6			91,2	69,1	239,7
	3776,0 TU			420	6,9		62,2	
Sephadex G-200	(3605,0 TU)	171	2,8			95,5	59,4	
	3500,0 TU			105	1,7		57,6	
Amicon UF 100	3276,8 TU	223	3,7			90,9	53,9	721,0
		913	15,0	1881	30,9			

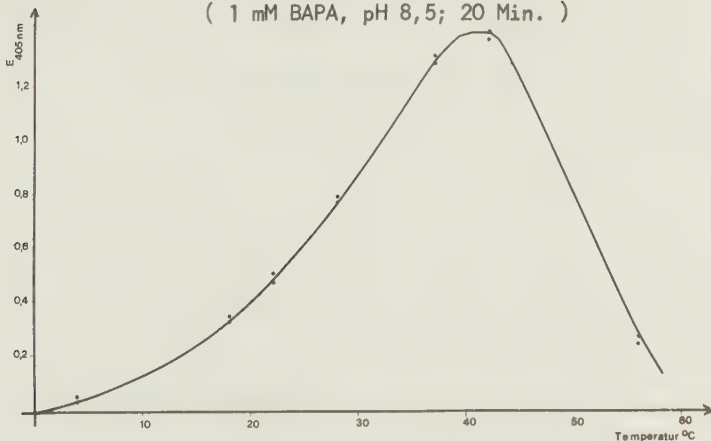
Tabelle 14 zeigt den Aktivitätsverlust bei den einzelnen Isolierungsschritten. Die reale Ausbeute (siehe Tabelle 14) war 53,9 % der eingesetzten Aktivität. Beachtet man aber den Aktivitätsverlust durch Zurückhalten der einzelnen Proben, ergibt die Summe der Aktivitätsverluste in den einzelnen Schritten ein Total von nur 15 %. Demnach wurden 85 % der eingesetzten Aktivität am Ende der Isolierung erhalten.

3.2. Charakterisierung des Tc-Enzyms

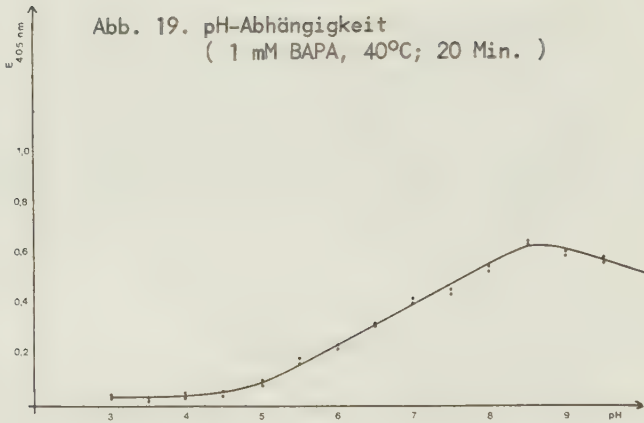
3.2.1. Optimale Reaktionsbedingungen

Bei der Bestimmung der optimalen Reaktionsbedingungen, wurde zunächst der optimale pH unter willkürlich festgesetzten Bedingungen (25°C, 20 Min. Inkubation) bestimmt, der Aktivitätspeak lag bei pH 8,5. Die Bestimmung des Temperatur-Optimums erfolgte bei pH 8,5 (20 Min. Inkubationszeit). Der Aktivitätspeak lag bei 40°C (siehe Abb. 18).

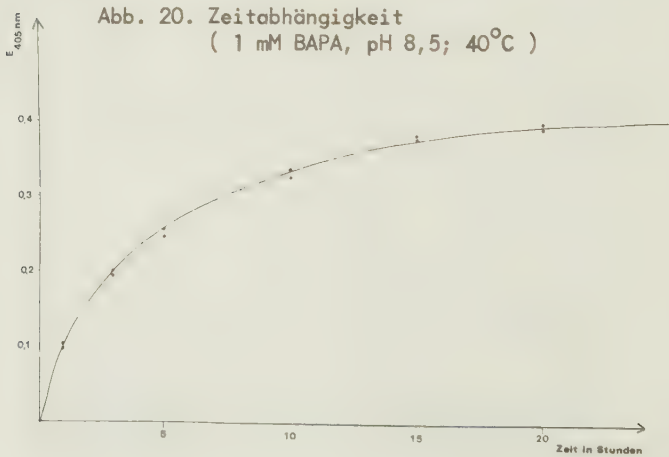
Abb. 18. Temperatur-Abhängigkeit
(1 mM BAPA, pH 8,5; 20 Min.)

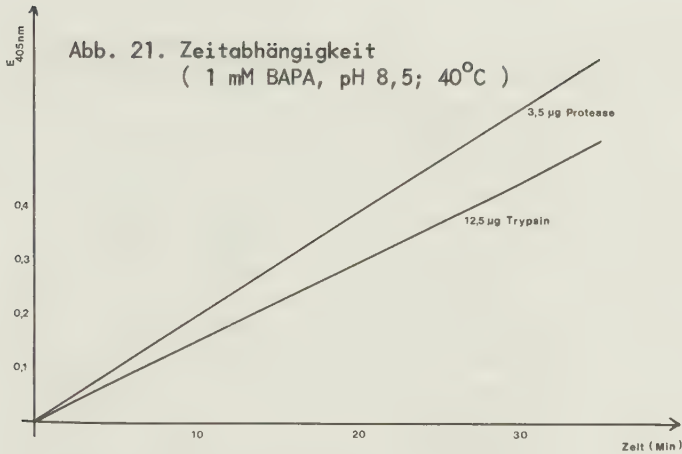


Nach der Bestimmung des Temperatur-Optimums wurde die Bestimmung des pH-Optimums wiederholt, erneut lag der Aktivitätspeak bei pH 8,5 (Abb. 19).



Bei der Bestimmung der optimalen Reaktionszeit zeigte sich, dass die Aktivität des Tc-Enzyms noch nach 20 Std. stetig anstieg (Abb. 20). In den ersten 60 Min. zeigte sich ein linearer Aktivitätsanstieg, daher wurde bei den Aktivitätsbestimmungen nach BAPA eine Inkubationszeit von 20 Min. als ausreichend festgesetzt (Abb. 21).





3.2.2. Molekulargewichtsbestimmung

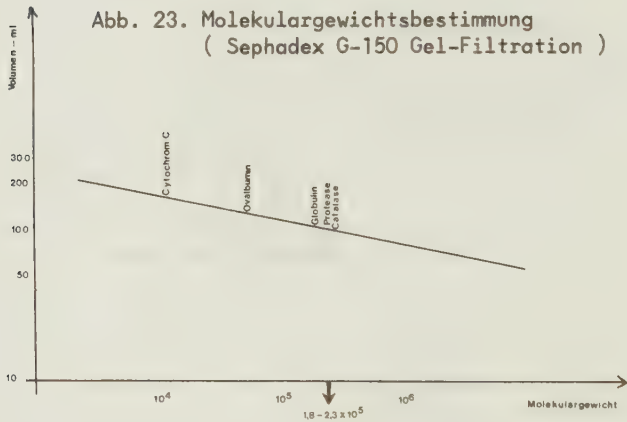
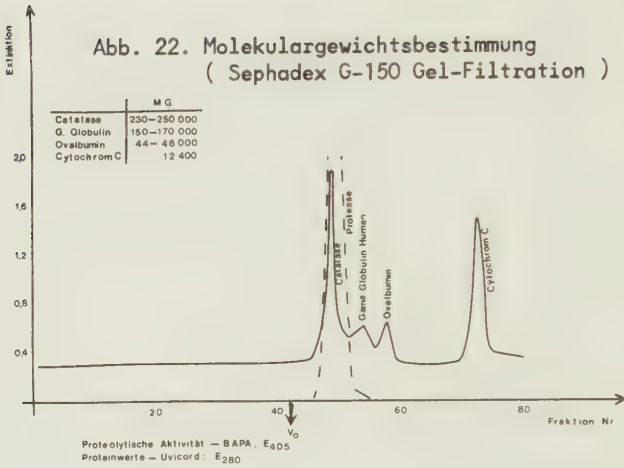
3.2.2.1. Sephadex G-150 Gel-Filtration

Bei einer Molekulargewichtsbestimmung durch Sephadex Gel-Filtration wurden die in Tabelle 15 angegebenen Substanzen als Standard verwendet.

Tabelle 15. Standardsubstanzen für die Molekulargewichtsbestimmung durch Gel-Filtration.

Substanz	Molekulargewicht
Cytochrom C	12 400
Ovalbumin	44 - 46 000
Humanes Gamma-Globulin	150 - 170 000
Rinder-Leber Catalase	230 - 250 000

Der Aktivitätspik des Tc-Enzyms lag zwischen den Proteinpeaks von Catalase und Gamma-Globulin (Abb. 22); nach dieser Methode liegt das Molekulargewicht des Tc-Enzyms bei 180 - 230 000 (Abb. 23).



3.2.2.2. SDS-Elektrophorese

Als Standard wurden bei dieser Methode Oligomere von Bovinem Serum-Albumin (BSA) eingesetzt, die durch erwärmen (70°C) von monomerem BSA bei 10^{-2} Torr (während 8 Std. über P₂O₅) erhalten wurden (siehe Tabelle 16).

Tabelle 16. Standardsubstanzen für die Molekulargewichtsbestimmung durch SDS-Elektrophorese.

Substanz	Molekulargewicht
Monomeres BSA	65 - 70 000
Dimeres BSA	130 - 140 000
Trimeres BSA	195 - 210 000
Tetrameres BSA	260 - 280 000

Das Tc-Enzym wurde nicht mit SDS vorbehandelt, der denaturierende Effekt des Dodecylsulfats erfolgte nur während der Elektrophorese, so dass ca. 20 % der aufgetragenen proteolytischen Aktivität nach der Elektrophorese noch erhalten blieben. Dies Abweichen vom normalen Verfahren wurde durch die geringe zur Verfügung stehende Tc-Enzym-Menge diktiert, da eine Protein-Bande bei den eingesetzten Konzentrationen nicht feststellbar war. Die proteolytische Aktivität wurde zwischen den von Dimerem und Trimerem BSA herrührenden Protein-Banden eluiert (Abb. 24), das Molekulargewicht lag also nach dieser Methode zwischen 160 und 210 000 (siehe Abb. 25).

Abb. 24. Molekulargewichtsbestimmung
(SDS-Elektrophorese)

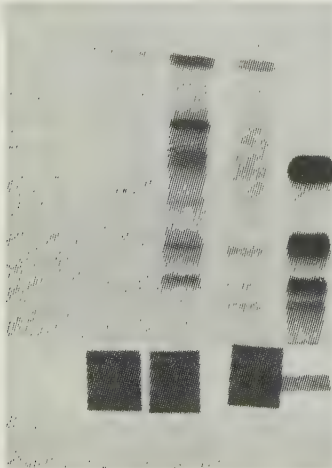
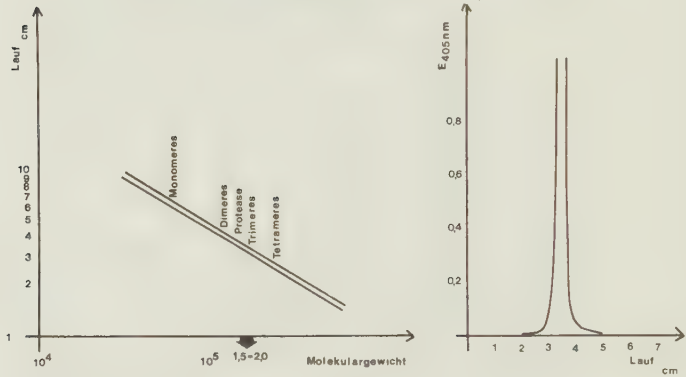


Abb. 25. Molekulargewichtsbestimmung
(SDS-Elektrophorese)



3.2.2.3. Gradienten-Gel-Elektrophorese

Wie bei der oben beschriebenen SDS-Elektrophorese wurden als Standard BSA-Oligomere verwendet. Die proteolytische Aktivität wurde erneut zwischen den Protein-Banden des Dimeren und Trimeren BSA eluiert (Abb. 26), jedoch etwas zu geringerem Molekulargewicht verschoben. Es lag zwischen 145 und 190 000 (Abb. 27).

Abb. 26. Molekulargewichtsbestimmung
(Gradienten-Gel-Elektrophorese)

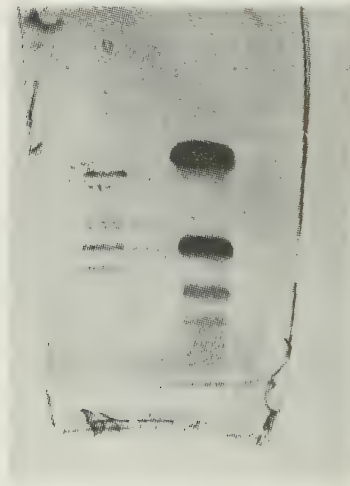
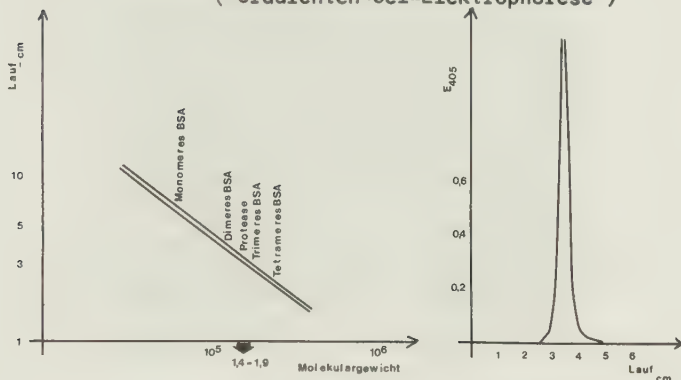


Abb. 27. Molekulargewichtsbestimmung
(Gradienten-Gel-Elektrophorese)



3.2.2.4. Zusammenfassung

Nach den drei oben beschriebenen Methoden liegt das Molekulargewicht des Tc-Enzyms zwischen 145 und 230 000. Bei den in dieser Arbeit vorgenommenen Berechnungen wurde 200 000 als Molekulargewicht des Tc-Enzyms verwendet.

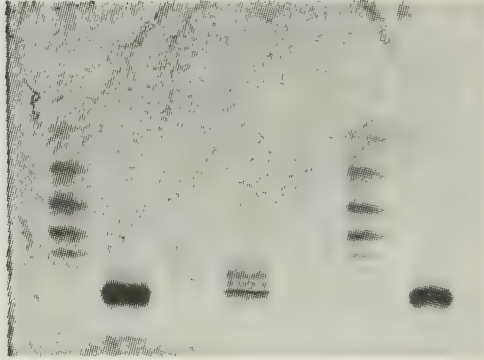
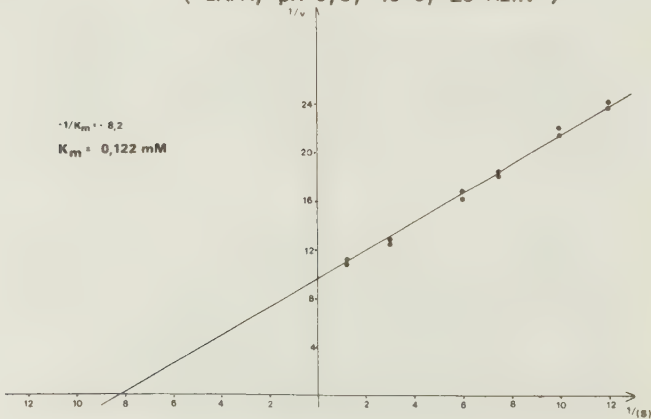
3.2.3. Isoelektrischer Punkt

Als Standard wurden β_2 I Glykoprotein und Praealbumin verwendet. Der Isoelektrische Punkt des Praealbumins - 4,7 - diente als Bezugspunkt. Da keine Protein-Bande als isoelektrischer Punkt des Tc-Enzyms definiert werden konnte, wurde er durch Elution des Tc-Enzyms aus dem Gel bestimmt. Der isoelektrische Punkt des Tc-Enzyms lag zwischen pH 5,3 und pH 5,8 (Abb. 28).

3.2.4. Michaelis-Konstante

Die Substratkonzentration, bei der die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht ist, lag bei der Spaltung von BAPA (unter den bei 2.4.1.1. angegebenen Reaktionsbedingungen) bei $1,22 \times 10^{-4}$ Mol / Liter (Abb. 29). Die Michaelis-Menten-Konstante wurde nach der Methode von Lineweaver und Burk⁵⁶ bestimmt.

Abb. 28. Bestimmung des isoelektrischen Punktes

Abb. 29. Michaelis-Konstante
(BAPA, pH 8,5; 40°C; 20 Min.)

3.2.5. Proteolytische Aktivität

3.2.5.1. Mit BAPA als Substrat

Bei der Bestimmung der proteolytischen Aktivität (Spaltung von BAPA) wurde für das hochgereinigte Tc-Enzym eine durchschnittliche spezifische Aktivität von ca. 470 TU / mg Protein festgestellt (siehe Tabelle 17). Da das Trypsin (laut Definition, siehe 2.4.1.1.) eine Aktivität von 100 TU / mg hat, kann folgende molare Relation aufgestellt werden :

Trypsin

$$MG = 20\,000$$

$$\begin{aligned}\text{Aktivität} &= 100\, \text{TU} / \text{mg} \\ &= 2 \times 10^9\, \text{TU} / \text{Mol}\end{aligned}$$

Tc-Enzym

$$MG = 200\,000$$

$$\begin{aligned}\text{Aktivität} &= 470\, \text{TU} / \text{mg} \\ &= 9,4 \times 10^{10}\, \text{TU} / \text{Mol}\end{aligned}$$

Somit weist Trypsin etwa 1/47tel der Aktivität des Tc-Enzyms unter den bei 2.4.1.1. angegebenen Reaktionsbedingungen auf.

Tabelle 17. Spezifische Aktivität einiger Tc-Enzym-Präparate

Fermenter	TU / ml	mg / ml	TU / mg
12	532	1,14	465,4
15	598	1,21	495
16	507,8	1,08	470,1
18	1058	1,47	721
22	94,5	0,25	377,8
24	1488,8	2,91	510,7
25	454,6	1,42	320,1
26	679,7	1,71	396,4
Mittellwert = 469,57			

3.2.5.2. Mit Casein als Substrat

Bei der Spaltung von Casein konnte folgende molare Relation aufgestellt werden :

Trypsin

$$MG = 20\,000$$

$$\begin{aligned}\text{Aktivität} &= 1\,000\, \text{TU} / \text{mg} \text{ (per Definition)} \\ &= 2 \times 10^{10}\, \text{TU} / \text{Mol}\end{aligned}$$

Tc-Enzym

$$MG = 200\,000$$

$$\begin{aligned}\text{Aktivität} &= 1,22\, \text{TU} / \text{mg} \\ &= 2,44 \times 10^8\, \text{TU} / \text{Mol}\end{aligned}$$

Somit weist Trypsin eine rund 100 fache Aktivität des Tc-Enzyms bei den unter 2.4.1.2. angegebenen Reaktionsbedingungen auf.

3.2.5.3. Mit Hämoglobin als Substrat

Bei der Spaltung von Hämoglobin konnte folgende molare Relation aufgestellt werden :

Trypsin

$$MG = 20\ 000$$

$$\begin{aligned} \text{Aktivität} &= 100\ \text{TU} / \text{mg} \ (\text{per Definition}) \\ &= 2 \times 10^9\ \text{TU} / \text{Mol} \end{aligned}$$

Tc-Enzym

$$MG = 200\ 000$$

$$\begin{aligned} \text{Aktivität} &= 1,89\ \text{TU} / \text{mg} \\ &= 3,8 \times 10^8\ \text{TU} / \text{Mol} \end{aligned}$$

Somit weist Trypsin eine rund 5 fache Aktivität des Tc-Enzyms bei den unter 2.4.1.3. angegebenen Reaktionsbedingungen auf.

3.2.5.4. Mit Fibrinogen als Substrat

Bei einer Spaltung von Fibrinogen konnte folgende molare Relation aufgestellt werden :

Trypsin

$$MG = 20\ 000$$

$$\begin{aligned} \text{Aktivität} &= 200\ \text{TU} / \text{mg} \ (\text{per Definition}) \\ &= 4 \times 10^9\ \text{TU} / \text{Mol} \end{aligned}$$

Tc-Enzym

$$MG = 200\ 000$$

$$\begin{aligned} \text{Aktivität} &= 29,7\ \text{TU} / \text{mg} \\ &= 5,9 \times 10^9\ \text{TU} / \text{Mol} \end{aligned}$$

Somit weist Trypsin in etwa die gleiche Aktivität wie das Tc-Enzym auf, unter den bei 2.4.1.4. angegebenen Reaktionsbedingungen.

3.2.6. Esterase-Aktivität

Bei der Spaltung von BAEE konnte folgende molare Relation aufgestellt werden :

Papain

MG = 23 000

Aktivität = 40,25 μ l NaOH 0,4 N / 0,01 mg Protein
 = $9,26 \times 10^{10}$ μ l NaOH 0,4 N / Mol

Tc-Enzym

MG = 200 000

Aktivität = 8,6 μ l NaOH 0,4 N / 0,082 mg Protein
 = $2,08 \times 10^{10}$ μ l NaOH 0,4 N / Mol

Somit weist Papain eine rund 4 fache Aktivität des Tc-Enzyms nach den unter 2.4.2. angegebenen Reaktionsbedingungen auf.

3.2.7. Transamidase-Aktivität

Bei der Transamidierungsreaktion konnte folgende molare Relation aufgestellt werden :

Papain

MG = 23 000

Aktivität = $E_{550 \text{ nm}} = 0,1 / 0,2 \text{ mg Protein}$
 = $E_{550 \text{ nm}} = 0,1 / 9,69 \times 10^{-9} \text{ Mol}$

Tc-Enzym

MG = 200 000

Aktivität = $E_{550 \text{ nm}} = 0,1 / 0,22 \text{ mg Protein}$
 = $E_{550 \text{ nm}} = 0,1 / 1,1 \times 10^{-9} \text{ Mol}$

Somit weist Papain eine rund 8 fache Aktivität des Tc-Enzyms bei den unter 2.4.3. angegebenen Reaktionsbedingungen auf.

3.2.8. Hemmung des Tc-Enzyms

3.2.8.1. Produkt-Hemmung

Die Spaltung von BAPA wird zu 50 % gehemmt, wenn

0,07 M Benzoyl-D,L-Arginin der Reaktion hinzugefügt werden (siehe Abb. 30). Die graphische Bestimmung nach Lineweaver und Burk⁵⁶ zeigte eine kompetitive Hemmung (siehe Abb. 31).

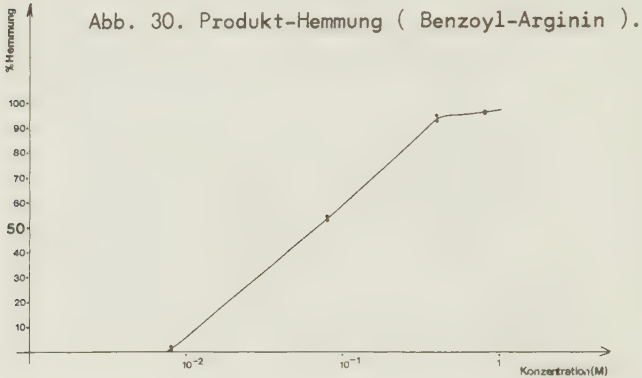
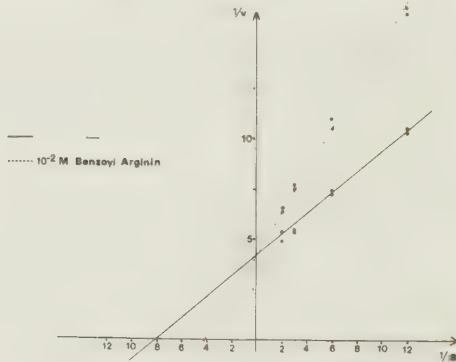


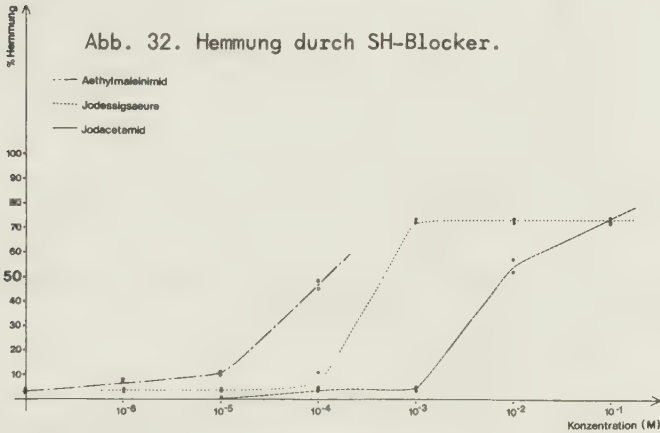
Abb. 31. Produkt-Hemmung (Benzoyl-Arginin - Kinetik im BAPA-Test).



3.2.8.2. Hemmung durch SH-Blocker

Die hemmende Wirkung von Jodacetamid (IAA), Jodessigsäure, N-Äthylmaleinimid (NEM) und Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF) auf die Spaltung von BAPA durch das Tc-Enzym wurde getestet.

PMSF zeigte keine hemmende Wirkung (bis zu einer Konzentration von $0,1 \text{ M}$ im Inkubationsvolumen), Jodacetamid zeigte eine Hemmung von 50% bei einer Konzentration von $8 \times 10^{-3} \text{ M}$, Jodessigsäure bei $4,8 \times 10^{-4} \text{ M}$ und NEM bei $2,5 \times 10^{-4} \text{ M}$ (siehe Abb. 32).



3.2.8.3. Hemmung durch bivalente Schwermetalle

Die 50% ige Hemmung des Tc-Enzyms wurde bei folgenden Ionenkonzentrationen erreicht :

$$\text{Cd}^{++} - 3,4 \times 10^{-3} \text{ M}$$

$$\text{Cu}^{++} - 5,2 \times 10^{-4} \text{ M}$$

$$\text{Zn}^{++} - 8,0 \times 10^{-4} \text{ M}$$

$$\text{Hg}^{++} - 2,9 \times 10^{-6} \text{ M}$$

Die Hemmungskurven sind in Abb. 33 und Abb. 34 aufgeführt.

3.2.8.4. Hemmung durch organische Hg-Verbindungen

Das Tc-Enzym wurde zu 50% gehemmt bei einer Konzentration von $8 \times 10^{-5} \text{ M}$ Thiocid (= p-(Äthyl-Mercuri)-Mercapto-Benzolsulfonsaures Natrium) und bei $8 \times 10^{-6} \text{ M}$ p-Chloro-Mercuri-Benzosäure (pCMB) (siehe Abb. 34).

Die Hemmung durch Thiocid war nicht kompetitiv (siehe Abb. 35).

Abb. 33. Hemmung durch bivalente Schwermetalle.

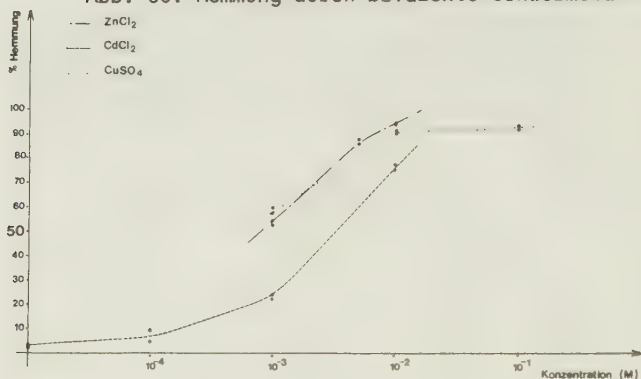
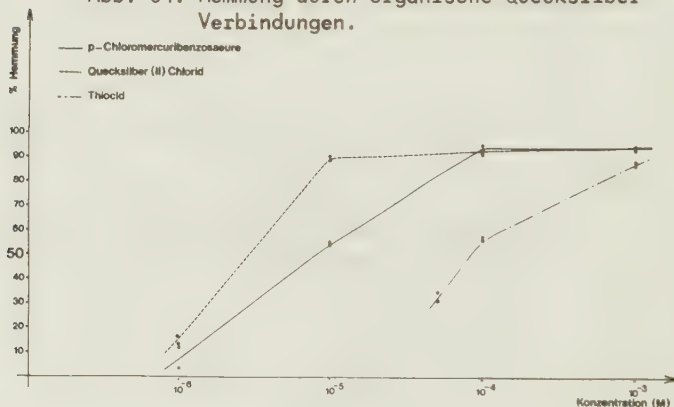


Abb. 34. Hemmung durch organische Quecksilber-Verbindungen.



3.2.8.5. Hemmung durch Trypsin-Inhibitoren

Die proteolytische Aktivität des Tc-Enzyms wurde bei einer Konzentration von $4,5 \times 10^{-8}$ M Tosyl-Lysyl-Chloromethyl-Keton (TLCK) zu 50 % gehemmt (siehe Abb. 36).

Das Tc-Enzym wurde nicht durch Antagosan (= Aprotinin = Boviner Trypsin-Kallikrein Inhibitor) bei einer Konzentration von 250 Antiplasmin Einheiten pro ml (Inkubationsvolumen = 1 ml) gehemmt, eine Konzentration, die im BAPA-Test entsprechende Mengen Trypsin zu 95 % hemmt.

Abb. 35. Hemmung durch Thiocid
(Kinetik im BAPA-Test)

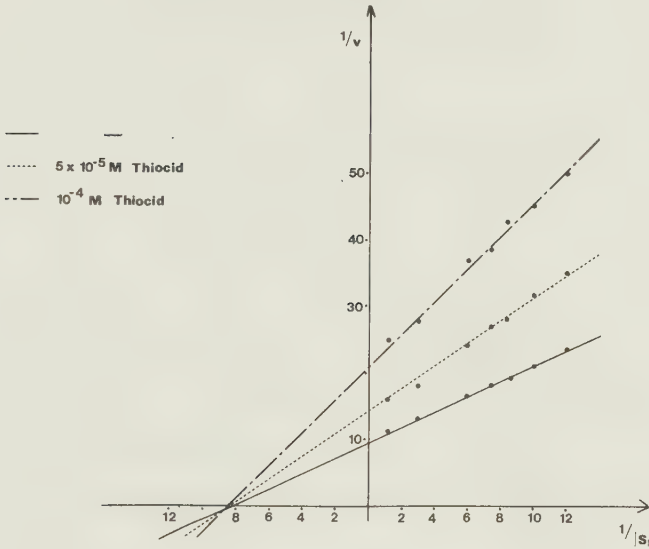


Abb. 36. Hemmung durch TLCK

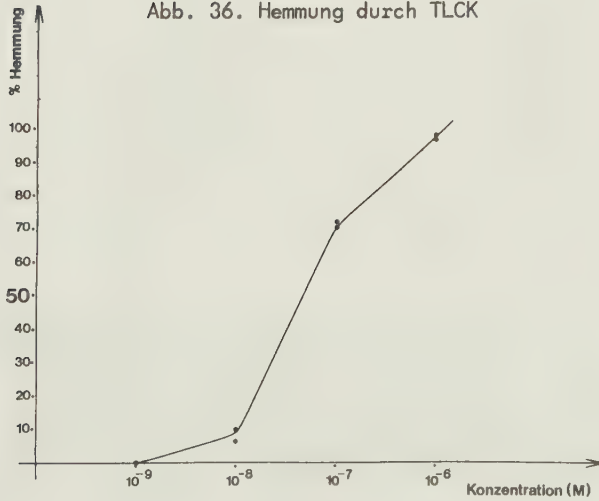
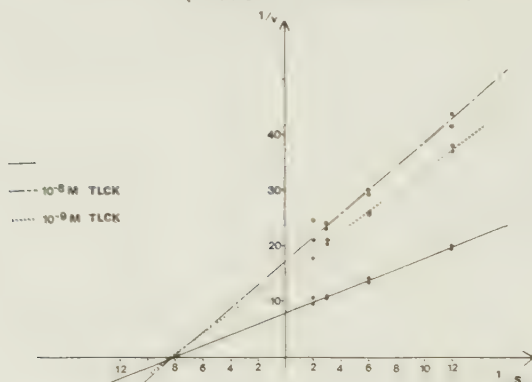


Abb. 37. Hemmung durch TLCK
(Kinetik im BAPA-Test)



3.2.8.6. Zusammenfassung der Hemmversuche

Substanz	50 % Hemmung (M)
Benzoyl-Arginin	$7,0 \times 10^{-2}$
CdSO ₄	$3,4 \times 10^{-3}$
IAA	$8,0 \times 10^{-3}$
NEM	$2,5 \times 10^{-4}$
Jodessigsäure	$4,8 \times 10^{-4}$
CuCl ₂	$5,2 \times 10^{-4}$
ZnCl ₂	$8,0 \times 10^{-4}$
Thiocid	$8,0 \times 10^{-5}$
HgCl ₂	$2,9 \times 10^{-6}$
pCMB	$8,0 \times 10^{-6}$
TLCK	$4,5 \times 10^{-8}$

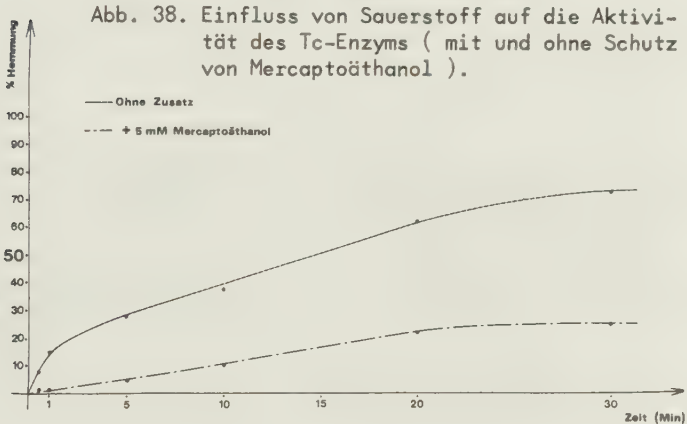
3.2.9. Sauerstoffeinfluss

3.2.9.1. Hemmung

Die Sauerstoffbehandlung der Tc-Enzym-Lösung wurde während 30 Min. bei Raumtemperatur durchgeführt, wobei darauf geachtet wurde, dass in dem Puffer keine SH-Gruppierungen schützende Substanzen (z.B. DTT) waren. Nach ca. 15 Min. Sauerstoffeinwirkung war das Tc-Enzym in seiner proteolytischen Aktivität zu 50 % gehemmt (Abb. 38).

3.2.9.2. Schutzeffekt einer SH-haltigen Verbindung

Eine 5 mM Mercaptoöthanol enthaltende Tc-Enzym-Lösung wurde wie bei 3.2.9.1. mit Sauerstoff behandelt. Nach 15 Min. war die proteolytische Aktivität des Tc-Enzyms nur zu 17 % gehemmt (siehe Abb. 38).



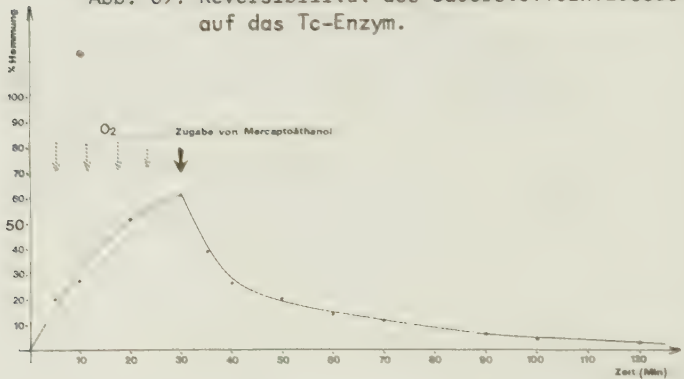
3.2.9.3. Reversibilität des Sauerstoffeinflusses

Das Tc-Enzym wurde wie bei 3.2.9.1. mit Sauerstoff behandelt. Danach wurde Mercaptoöthanol hinzugefügt (Konzentration im Inkubationsvolumen = 5 mM), und jeweils nach den angegebenen Zeiten die proteolytische Aktivität bestimmt. Abb. 39 zeigt die Reversibilität der Aktivitätsminderung durch Einwirkung von Sauerstoff : das Tc-Enzym, durch die Behandlung in 30 Min. zu 62 % gehemmt, zeigte nach weiteren 90 Min. der Inkubation mit Mercaptoöthanol eine Hemmung von nur noch 2 % im Vergleich zur Ausgangsprobe.

3.2.9.4. Einfluss von SH-Inhibitoren während der Sauerstoffbehandlung

Vor Beginn der Sauerstoffbehandlung wurde die Tc-Enzym-Lösung mit Phenylmethansulfonylfluorid, bzw. Jodacetamid versetzt. Die Konzentrationen der Substanzen im Inkubationsvolumen war 0,1 μ M PMSF / ml

Abb. 39. Reversibilität des Sauerstoffeinflusses auf das Tc-Enzym.



und 10 μM IAA / ml. Die in Tabelle 18 aufgeführten Resultate zeigen einen Schutz dieser Substanzen gegen eine Verminderung der Aktivität durch Sauerstoffeinwirkung. Die eingesetzten Konzentrationen der Inhibitoren selbst war nicht ausreichend, um eine Hemmung des Tc-Enzyms zu verursachen (siehe 3.2.8.2.).

Tabelle 18. Schutzwirkung von IAA und PMSF gegen eine Inaktivierung durch Sauerstoff.

Zeit* (Min.)	Ohne Zusatz		+ PMSF		+ IAA	
	TU/ml	% Hemmung	TU/ml	% Hemmung	TU/ml	% Hemmung
0	1,07	0	1,07	0	1,06	0
10	0,80	25	1,1	0	1,02	3,8
20	0,51	53	1,1	0	1,06	0
30	0,40	63	1,1	0	1,1	0

* = Dauer der Sauerstoffeinwirkung

3.3. Chemische Zusammensetzung des Tc-Enzyms

3.3.1. Aminosäuren-Zusammensetzung

Die Bestimmung wurde an hochgereinigtem Tc-Enzym ausgeführt. Tabelle 19 zeigt die Aminosäuren-Analyse einer repräsentativen Probe. Die Disk-Elektrophorese wies zwar vor der Hydrolyse der Tc-Enzym-Lösung nur

eine einzige Protein-Bande auf, bei einer Immunelektrophorese (siehe Abb. 40), und auch bei einer bidimensionalen Immunelektrophorese (siehe Abb. 41) zeigten sich neben einer aktiven Hauptkomponente mehrere Protein-Banden, jedoch von geringer Konzentration. Ergebnisse von Bestimmungen an analog gereinigten Präparaten ergaben im Wesentlichen übereinstimmende Werte.

Abb. 40. Immunelektrophorese des hochgereinigten Tc-Enzyms gegen das spezifische Antiserum (Kaninchen).



Abb. 41. Bidimensionale Elektrophorese des hochgereinigten Tc-Enzyms gegen das spezifische Antiserum (Kaninchen).



3.3.2. Kohlehydrat-Bestimmung

3.3.2.1. Reduktionswert nach Park-Johnson

Eine hochgereinigte Tc-Enzym-Lösung wurde nach Ausdialysieren des Mercaptoöthanol hydrolysiert und der Reduktionswert bestimmt. Die Verwendung von Glukose als Vergleichswert ergab für eine Lösung mit 0,39 mg Protein / ml ein Äquivalent von 0,0085 mg Glukose / ml.

Somit enthält das Tc-Enzym ca. 0,022 mg Glukose-Äquivalent pro Milligramm Protein, i.e., ca. 2 % Zucker (reduzierende Substanzen).

Tabelle 19. Aminosäure-Zusammensetzung des
Tc-Enzyms

Aminosäure	nmol AS-Rest / ml Probe	Rest / 100 Reste
Lysin	865	5,47
Histidin	311	1,52
Ammoniak	(2871)	(18,14)
Arginin	724	4,57
Asparaginsäure	1498	9,47
Threonin	949	6,00
Serin	806	5,09
Glutaminsäure	1623	10,26
Prolin	764	4,83
Glycin	1292	8,16
Alanin	1378	8,71
Cystin (halb)	368	2,33
Valin	1292	8,16
Methionin	451	2,85
Isoleucin	758	4,79
Leucin	1442	9,11
Tyrosin	244	1,54
Phenylalanin	731	4,63
Tryptophan	330	2,09
Total	15826	100,00

3.3.2.2. Kohlehydrat-Zusammensetzung nach Dünnschicht- Chromatographie

Ein hochgereinigtes Tc-Enzym-Präparat wurde dialysiert und mit Schwefelsäure hydrolysiert. Das mit $\text{Ba}(\text{OH})_2$ gerade neutralisierte Hydrolysat wurde auf Cellulose-Dünnschichtplatten chromatographiert und nach Trevelyan⁶¹ entwickelt. Die Hauptbestandteile waren :

Glukose
Galaktose
Manose
Xylose
Glukosamin

Es konnten auch nicht in Spuren Ribose und Desoxy-ribose gefunden werden (siehe Abb. 42).

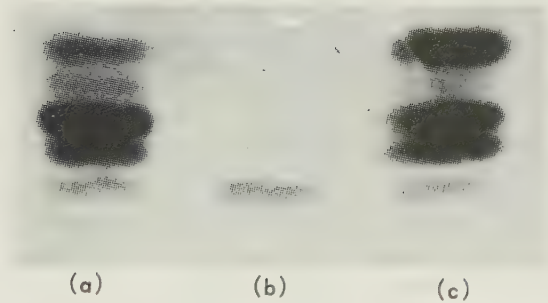
Abb. 42. Chromatographische Kohlehydrat-Bestimmung.

(a) Tc-Enzym-Hydrolysat

(b) Glukosamin

(c) Standard-Mischung

Banden (von unten) : Glukosamin
Galaktose
Glukose
Manose
Xylose



3.4. Spezifität des Tc-Enzyms

3.4.1. Spaltung niedermolekularer Substrate

3.4.1.1. Spaltung von Aminosäure-p-nitroaniliden

Tabelle 20 zeigt die Aktivität des Tc-Enzyms gegenüber einiger Aminosäure-p-nitroaniliden. Die Spaltung der Nitroanilide wurde nach der bei 2.4.1.1. beschriebenen Methode nach Erlanger verfolgt (1 mM Substrat, 20 Min. Inkubation bei 40°C; pH 8,5 - Davies-Puffer). Als Bezugssubstanz wurde Trypsin eingesetzt. Wie aus Tabelle 20 ersichtlich, spaltete das Tc-Enzym allein das α -N-Benzoyl-Arginin-p-nitroanilid (BAPA, siehe 3.2.5.1.) und das α -N-Benzoyl-Lysin-p-nitroanilid. Überraschenderweise wurde das Lysin-p-nitroanilid praktisch nicht gespalten.

Das Tc-Enzym zeigte eine rund 2 fache Aktivität gegenüber dem α -N-Benzoyl-Arginin-p-nitroanilid im Vergleich zum α -N-Benzoyl-Lysin-p-nitroanilid (siehe Tabelle 20).

Tabelle 20. Aktivität des Tc-Enzyms gegenüber Aminosäure-p-nitroaniliden.

	Tc-Enzym		Trypsin	
	E _{405nm}	% Aktivität	E _{405nm}	% Aktivität
Benzoyl-Arg-PA	1,417	100,0	0,461	100,0
Acetyl-Tyr-PA	0,044	3,1	0,003	0,6
Ala-PA	0,032	2,2	0,007	1,5
Glu-1-PA	0,053	3,7	0,008	1,7
Glu-5-PA	0,054	3,8	0,007	1,5
Gly-PA	0,045	3,1	0,005	1,1
Leu-PA	0,100	7,0	0,006	1,3
Lys-PA	0,071	5,0	0,019	4,1
Phe-PA	0,089	6,2	0,005	1,1
Pro-PA	0,042	2,9	0,004	0,9
Benzoyl-Lys-PA	0,748	52,7	0,181	39,3

3.4.1.2. Spaltung von Tryptophan-naphtylamid

Die Spaltung von Tryptophan-naphtylamid wurde in Bezug auf eine Naphtylamin-Eichkurve berechnet. Als Kontrolle wurde Trypsin (0,25 mg / ml HCl 0,001 N) eingesetzt, welches das Substrat erwartungsgemäss nicht spaltete. Die Extinktion von 0,1 μ M Naphtylamin bei 578 nm wurde als Aktivitäts-Einheit bezeichnet (bei den unter 2.4.11.2. beschriebenen Bedingungen). Demnach spaltet 1 ml einer Tc-Enzym-Lösung, die 270,5 TU_{BAPA} entspricht, also einer Aktivität, die ca. 760 μ M p-Nitroanilin freisetzt, 1,13 μ M Tryptophan-naphtylamid.

$$1 \text{ ml Tc-Enzym} - E_{578\text{nm}} = 1,121 = 11,4 \text{ TU}_{\text{Try-napht.}}$$

$$1 \text{ ml Trypsin} - E_{578\text{nm}} = 0,055 = 0,5 \text{ TU}_{\text{Try-napht.}}$$

3.4.2. Spaltung von Oligopeptiden

Ein Tc-Enzym-Präparat wurde erschöpfend gegen Tris-Puffer, der mit 5 mM Mercaptoethanol versetzt war, dialysiert. Ein Aliquot der Lösung wurde mit gleicher Menge des Oligopeptids versetzt und nach 20 Min.

Inkubation bei 40°C auf Cellulose-Platten zur Dünnschichtchromatographie aufgetragen und elektrophoreseiert. Simultan wurden Kontrollen - reine Aminosäuren, reine Dipeptide und reines Tc-Enzym, jeweils in Puffer aufgenommen - aufgetragen.

Die Konzentration der Oligopeptide wurde so gewählt, dass noch eine Spaltung von 5 % unter den angegebenen Bedingungen einen klar bestimmbaren Fleck der Spaltprodukte mit Ninhydrin aufweisen konnte.

Die Auswertung der Dünnschichtchromatographie-Platten zeigte, dass das Tc-Enzym von den unten aufgeführten Oligopeptiden nur Arginyl-Leucin, Tryptophyl-Glycin und Tri-Lysin spaltete (siehe Abb. 43). Lysyl-Phenylalanin wurde jedoch nicht gespalten.

Verwendete Oligopeptide : Spaltung

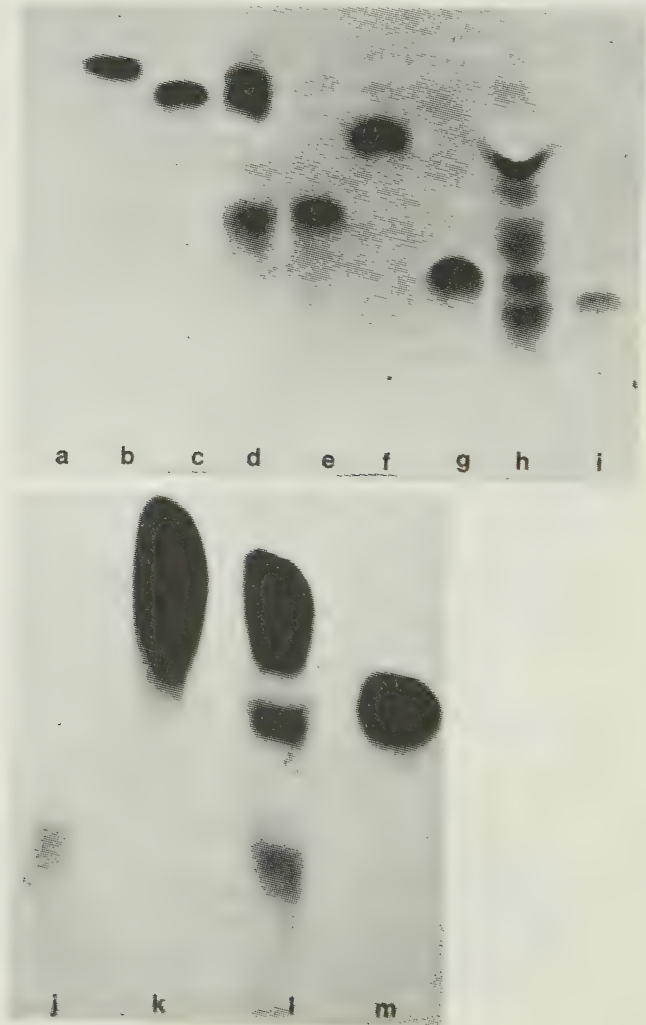
L-Alanyl-L-Isoleucin	-
L-Arginyl-L-Leucin.Acetat	+
α -L-Aspartyl-L-Leucin	-
Glycyl-L-Leucin	-
α -L-Glutamyl-L-Tyrosin	-
L-Histidinyll-L-Lysin.HBr	-
D,L-Leucyl-D,L-Alanin	-
L-Lysyl-L-Phenylalanin	-
L-Methionyl-L-Asparagin	-
L-Phenylalanyl-L-Leucin	-
L-Prolyl-L-Leucin	-
L-Seryl-Glycin	-
Tri-L-Lysin. 3 HBr	+
Glycyl-L-Histidyl-Glycin	-
L-Threonyl-L-Phenylalanin	-
L-Tryptophyl-Glycin	+
L-Tyrosyl-L-Leucin	-
L-Valyl-Glycin	-

3.4.3. Fingerprint

Ein wesentlicher Punkt bei der Durchführung der Fingerprint-Technik war, dass eine Reihe von Tc-Enzym-Präparationen sich schon ohne Inkubation bei der Entwicklung als mit niedermolekularen Verunreinigungen behaftet herausstellten. Es wurde deshalb eine Tc-Enzym-Präparation gewählt, die von vorneherein nur

Abb. 43. Spaltung von Oligopeptiden

(a) = (j) = Tc-Enzym; (b) Arg;
 (c) Arg-Leu; (d) Arg-Leu + Tc-Enzym
 (e) Leu; (f) Gly; (g) Try-Gly;
 (h) Try-Leu + Tc-Enzym; (i) Try;
 (k) Tri-Lys; (l) Tri-Lys + Tc-Enzym
 (m) Lys.



Spuren von Verunreinigungen aufwies, diese 4 Tage gegen Tris-Puffer, der 5 mM Mercaptoöthanol enthielt, dialysiert. Das so vorbehandelte Tc-Enzym wurde elektrophoresiert und die Platte mit Ninhydrin gefärbt. Es zeigten sich keine definierten Flecke niedermolekularer Verunreinigungen. Das carboxymethyl-Lysozym* wurde ebenfalls zuvor auf in der Fingerprint-Technik nachweisbaren Verunreinigungen untersucht.

Als Eichenzym wurde Trypsin im Verfahren mitlaufen gelassen, das in der Lage war, nach 24. Std. Reaktion das sich in Suspension befindliche, wenig lösliche carboxymethyl-Lysozym in eine klare Lösung zu überführen. Bei dem Tc-Enzym hingegen war das nicht der Fall. Daher musste auf die Dünnschichtchromatographie-Platte ein Aliquot der zentrifugierten Suspension aufgetragen werden. Die Auswertung der Platten (durch Färbung mit Ninhydrin) zeigte, dass die Anzahl der Flecke auf der Tc-Enzym-Platte grösser war als die der Trypsin-Platte. Einige Flecke beider Platten scheinen übereinzustimmen, es kann aber nicht von gleichen Platten gesprochen werden. Auch zeigte die Tc-Enzym-Platte mehrere Flecke auf der anodischen Seite der Platte, neben den auf der kathodischen Seite, während die Trypsin-Platte allein auf der kathodischen Seite der Platte Flecken aufwies (siehe Abb. 44).

3.5. Immunologische Charakterisierung des Tc-Enzyms

3.5.1. Reaktionen mit verschiedenen Anti - T. cruzi - Seren

3.5.1.1. Anti - T. cruzi (Kulturform D₁) - Ziegen-Serum**

Ziegen wurden mit dem Überstand der durch Ultraschall aufgeschlossenen Trypanosomen immunisiert (mit einem Total von 22 mg Protein innerhalb von 2 Monaten) und entblutet, als das Serum der betreffenden Ziege einen IHA-Titer (siehe 2.4.12.1.3.) von 1 : 1024 erreicht hatte.

Die Aktivität des Tc-Enzyms wurde von einer Reihe von solchen Ziegen-Seren nicht gehemmt, sowohl BAPA als auch Casein wurden ohne Minderung der Aktivität wie zuvor gespalten (siehe Tabelle 21).

* Dr. Zilg danke ich für die Überlassung des Substrats

** Dr. Baudner danke ich für die Immunisierung der Tiere

Abb. 44. Fingerprint
(a) Tc-Enzym; (b) Trypsin

a)



b)

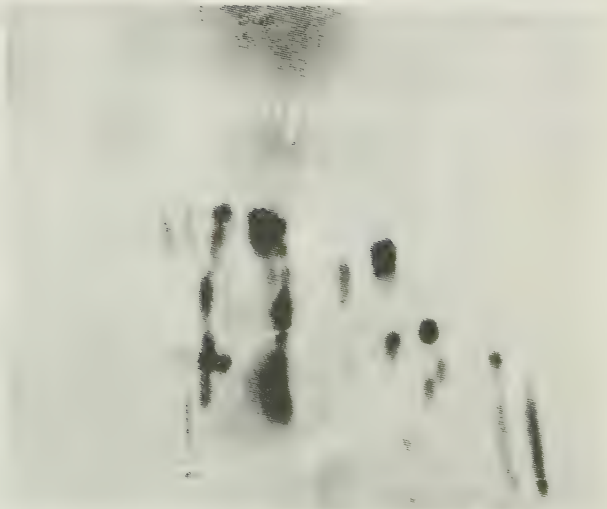
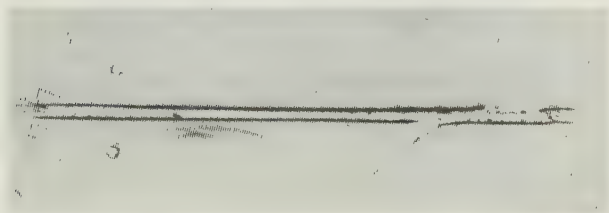


Tabelle 21. Aktivität des Tc-Enzyms in Gegenwart von Antiserum (Ziege).

Serum (Konzentration in μ l)	BAPA Aktivität TU/ml	Casein Aktivität TU/ml
0	365,9	0,95
5	354,5	0,98
10	355,0	0,98
20	360,2	0,96
50	364,3	0,96

Eine Immunelektrophorese (siehe 2.4.6.2.) und eine Immunodiffusion (siehe 2.4.6.4.) des hochgereinigten Tc-Enzyms gegen solche Ziegen-Seren zeigten keine Präzipitationslinien. Wurde statt des hochgereinigten Tc-Enzyms der unbehandelte Ausgangsüberstand verwendet, zeigten sich jedoch mehrere Präzipitationslinien (siehe Abb. 45).

Abb. 45. Immunelektrophorese des ungereinigten Ausgangsüberstandes gegen das Anti - T. cruzi - Ziegen Serum



3.5.1.2. Anti - T. cruzi (Kulturform D₁) - Kaninchen-Serum**

Zwei Kaninchen wurden mit dem T. cruzi - Ausgangsüberstand in einem Total von 71 mg pro Tier während 35 Tagen immunisiert und entblutet, als der IHA-Titer (siehe 2.4.12.1.3.) einen Wert von 1 : 8192 erreichte. Im Gegensatz zu den Antiseren die von den Ziegen gewonnen wurden, konnte mit dem Kaninchen-Hyperimmun-Serum die proteolytische Aktivität des

** Dr. Baudner danke ich für die Immunisierung der Tiere

Tc-Enzyms gehemmt werden. So hemmten 6 μ l des Anti-Serums 50 % von 2,5 TU in einem BAPA-Test (siehe Abb. 46).

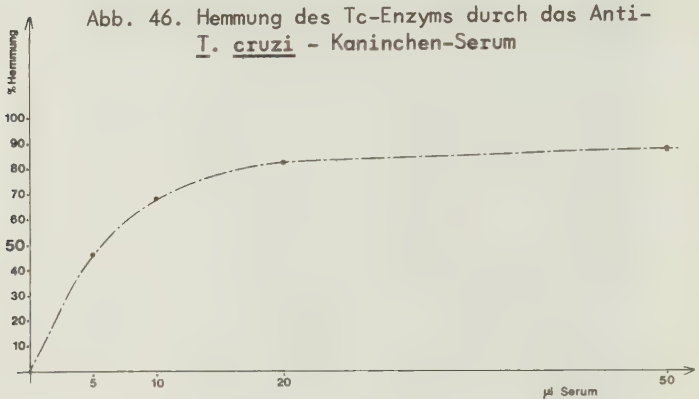
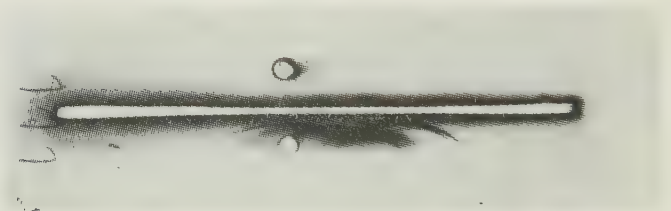


Abb. 47. Immunelektrophorese des hochgereinigten Tc-Enzyms gegen das Anti- T. cruzi - Kaninchen-Serum



Eine Immunelektrophorese dieses Serums gegen das hochgereinigte Tc-Enzym zeigte einige Präzipitationslinien (siehe Abb. 47).

3.5.1.3. Seren von Chagas-Patienten***

Ein Serum wurde einem Probanden entnommen, der sich im Laboratorium der Behringwerke mit T. cruzi (Stamm Brasil) infizierte und mit Lampit^R behandelt worden war. Zwei weitere Seren wurden Patienten im akuten Stadium der Chagas-Krankheit und zwei im

*** Dr. Enders danke ich für die Überlassung der Seren

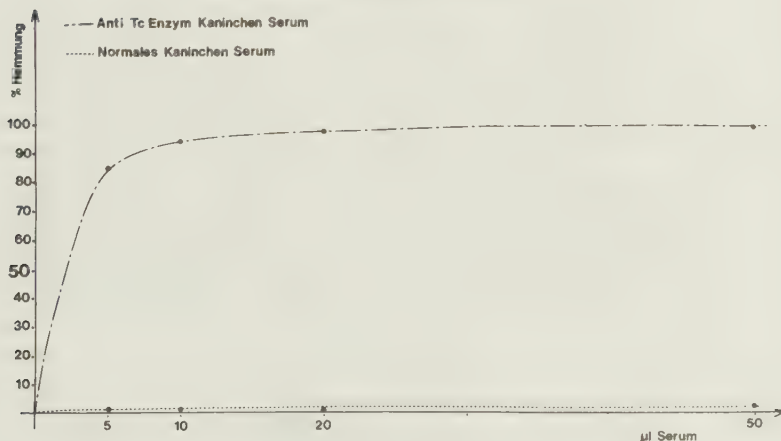
chronischen Stadium entnommen. Sie stammten aus einem endemischen Gebiet Brasiliens. Der Zeitpunkt der Infektion ist unbekannt.

Das hochgereinigte Tc-Enzym wurde von diesen Seren - wie auch von den Normal-Seren - nicht gehemmt (sowohl BAPA wie auch Casein wurden eingesetzt); eine Immunelektrophorese (siehe 2.4.6.2.) des Tc-Enzyms gegen diese Seren zeigte keine Präzipitationslinien.

3.5.1.4. Anti - Tc-Enzym - Serum (Kaninchen)

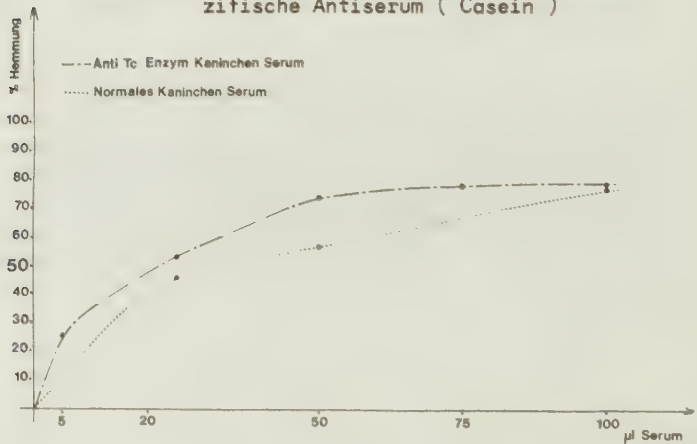
Das Anti - Tc-Enzym - Serum (Kaninchen) wurde wie bei 2.4.12.J. beschrieben erhalten. Die Kaninchen wurden entblutet, als die Seren einen IHA-Titer (siehe 2.4.12.1.2.) von 1 : 64 erreicht hatten, da zu diesem Zeitpunkt 2,5 μ l des Serums ausreichten, um 2,5 TUBAPA zu 50 % zu hemmen (siehe Abb. 48), wenn man das zum Immunisieren verwendete Tc-Enzym im BAPA-Test auswertete, nach einer Inkubation von 20 Min. bei 40°C mit dem spezifischen Antiserum. Eine Kontrolle mit dem Serum nicht behandelter Kaninchen zeigte keine Hemmung des Tc-Enzyms im BAPA-Test.

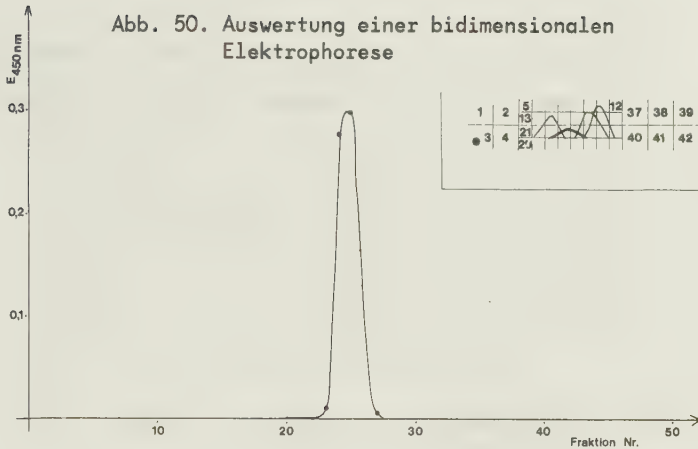
Abb. 48. Hemmung des Tc-Enzyms durch das spezifische Antiserum (BAPA)



Auch die Spaltung von Casein durch das Tc-Enzym wurde durch das spezifische Anti-Serum gehemmt : 25 μ l des Serums hemmten 4,0 TU_{Casein} zu 50 % (nach einer Inkubation von 20 Min. bei 40°C). Die Kontrolle mit Serum nicht behandelter Kaninchen zeigte jedoch, dass die Spaltung von Casein durch das Tc-Enzym schon von dem Null-Serum gehemmt wird : 35 μ l des Serums nicht behandelter Kaninchen hemmten 4,0 TU_{Casein} zu 50 % (siehe Abb. 49). Eine Immunelektrophorese (siehe 2.4.6.2.) des hochgereinigten Tc-Enzyms gegen das spezifische Antiserum zeigte mehrere Präzipitationslinien (siehe Abb. 40), desgleichen eine bidimensionale Immunelektrophorese (siehe Abb. 41). Die Auswertung der Platten nach BAPA (siehe 2.4.6.1.IV.) zeigte jedoch, dass nur eine einzige Bande die proteolytische Aktivität beinhaltetete, die anderen Banden, die etwas diffus waren, zeigten keine proteolytische Aktivität (siehe Abb. 50).

Abb. 49. Hemmung des Tc-Enzyms durch das spezifische Antiserum (Casein)





3.5.2. Aktiver Mäuse-Schutzversuch

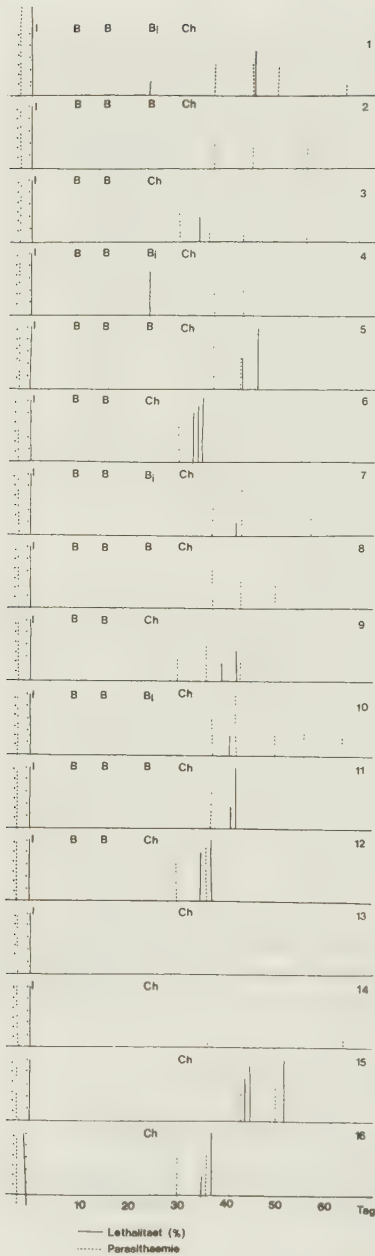
Das Ergebnis des Mäuse-Schutzversuches wurde durch den Einfluss der Mäuse-Seren auf das Tc-Enzym bestimmt. Die am Tag 22 unternommenen Kontrollen zeigten ein negatives Resultat : keines der eingesetzten Seren zeigte einen Einfluss auf die Aktivität des Tc-Enzyms bei der Spaltung von BAPA. Da die Kontrolle am Tag 30 ebenfalls negativ ausfiel, wurde der Einfluss der Mäuse-Seren auf das Tc-Enzym bei der Spaltung von Casein untersucht. Es zeigte sich, dass das Tc-Enzym von allen Seren in gleichem Masse - ca. 15 % der eingesetzten Aktivität - gehemmt wurde; inklusive dem als zusätzliche Kontrolle eingesetztem Serum normaler Mäuse. Demnach wurde mit dem unternommenen Schutzversuch kein Resultat erzielt, wie auch aus Abb. 51 zu ersehen ist, wo die Parasithämie-Kurven der einzelnen Versuche aufgezeichnet sind, wie auch die Lethalität - prozentual - angegeben ist.

3.5.3. Versuche mit permanenten Zellkulturen

3.5.3.1. Eindringen von T. cruzi in HeLa-Zellkulturen

Zur quantitativen Auswertung des Einflusses von Antikörpern auf das Eindringen der Trypanosomen in Zellen

Abb. 51. Ergebnisse des
aktiven Mäuse-
Schutzversuches



einer Zellkultur war es zunächst notwendig, die Konzentration von T. cruzi (Stamm Brasil) zu bestimmen, die reproduzierbar etwa 10 % der Zellen infiziert. Dazu wurde eine Verdünnung von T. cruzi - haltigem Blut von Mäusen auf HeLa-Zellkulturen in Leighton-Tubes 48 Std. einwirken gelassen. Nach Mediumwechsel wurden die Kulturen weitere 48 Std. inkubiert und danach wurden die Plättchen aus den Leighton-Tubes entfernt, gewaschen und nach Giemsa gefärbt (siehe 2.4.12.3.1.). Dabei ergab sich unter diesen Bedingungen, dass eine Konzentration von 8×10^6 Trypanosomen / ml (bzw. 24×10^6 Trypanosomen / Leighton-Tube) eine homogene Infektion von etwa 10 % der Zellen ergab (siehe Tabelle 22).

Tabelle 22. Infektionsrate von HeLa-Zellen durch T. cruzi (Stamm Brasil)

<u>T. cruzi</u> / ml	<u>T. cruzi</u> / Leighton-Tube	% Infizierter Zellen
1×10^6	3×10^6	ca. 2 %
2×10^6	6×10^6	" 2 %
4×10^6	12×10^6	" 5 %
6×10^6	18×10^6	" 5 %
8×10^6	24×10^6	" 10 %
10×10^6	30×10^6	" 10 %

3.5.3.2. Einfluss des spezifischen Anti - Tc-Enzym - Gamma-Globulins auf das Eindringen der Trypanosomen in Zellkulturen

Im Gegensatz zu der oben beschriebenen Austestung der optimalen Infektionsdosis, wurde das Trypanosoma-haltige Blut hier nicht mit reinem Eagle's Medium sondern mit Eagle's Medium, das steigende Mengen Antikörper bzw. Serum enthielt, verdünnt. Die Suspensionen enthielten dann jeweils 8×10^6 Trypanosomen / ml und die in Tabelle 23 angegebenen Konzentrationen Antikörper bzw. Antiserum.

Nach 48 Std. wurde das Medium gewechselt und die Zellkulturen weitere 48 Std. mit unsubstituiertem Medium inkubiert. Nach Anfärben der Kulturen nach Giemsa

Tabelle 23. Einfluss des spezifischen Antiserums auf das Eindringen von T. cruzi in HeLa-Zellen

A = Anti-Tc-Enzym-Gamma-Globulin (Kan.)

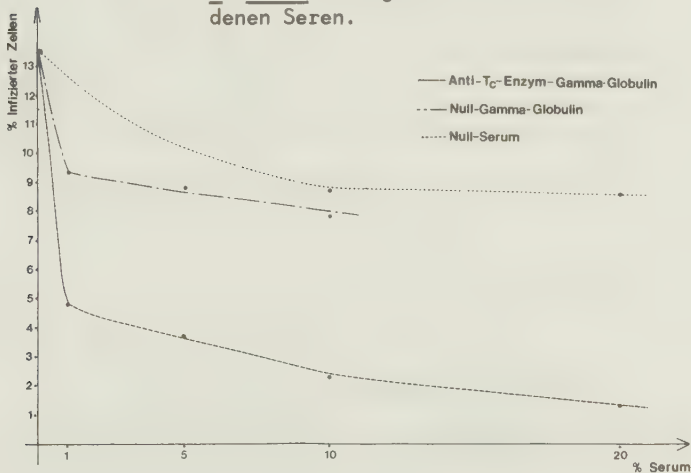
B = Normales Gamma-Globulin (Kan.)

C = Normales Kaninchen Serum

Zusatz	Ausgezählte Total	Zellen Infiz.	% Infiz. Zellen	Mittelwert	% Hemmung
—	1004	113	11,25	13,5	0
—	1066	130	12,19		
—	1054	178	16,89		
1 % A	1031 1075	51 50	4,95 4,65	4,8	64,0
5 % A	1036 1039	39 41	3,76 3,95	3,8	72,0
10 % A	1022 1069 1006	24 25 22	2,35 2,34 2,19	2,3	82,5
20 % A	1096 1015 1064	19 12 12	1,78 1,18 1,13	1,3	90,0
1 % B	1001 1065	98 94	9,79 8,83	9,3	30,5
5 % B	1002 1035	92 90	9,18 8,69	8,9	35,0
10 % B	1080	85	7,87	7,8	39,0
10 % C	1111 1037	99 89	8,91 8,58	8,7	34,0
20 % C	1054 1081	85 98	8,06 9,06	8,6	36,0

wurde jeweils die Zahl der infizierten Zellen von etwa 1000 wahllos betrachteten Zellen bestimmt (Tabelle 23, Abb. 52). Dabei zeigte sich, dass das spezifische Anti - Tc-Enzym - Gamma-Globulin einen starken Einfluss auf die Formation der Pseudo-Zysten hatte. Bei einem Zusatz von 20 % des spezifischen Gamma-Globulins in der Trypanosoma-Suspension wurden nur etwa 14 Zellen je 1000 Zellen als infiziert gefunden, im Gegensatz zu der Infektionskontrolle, bei der etwa 140 Zellen pro 1000 ausgezählter Zellen infiziert waren. Darüberhinaus ist bemerkenswert, dass bereits 0,5 % des Anti - Tc-Enzym - Gamma-Globulins ausreichend war, um die Infektionsrate im Vergleich zu der Kontrolle um etwa 50 % herabzusetzen (siehe Abb. 52). Dagegen war der Einfluss von Null-Serum, bzw. von Null-Gamma-Globulin auf das Eindringen der Trypanosomen wesentlich geringer. Etwa 90 Zellen bei 1000 ausgezählten Zellen waren jeweils infiziert.

Abb. 52. Infektionsrate der HeLa-Zellen durch T. cruzi in Gegenwart von verschiedenen Seren.



3.6. Vergleich mit analog gewonnenen Proteasen anderer Flagellaten

3.6.1. Proteolytische Aktivität

Um möglicherweise eine weitere Antwort auf die Frage nach der Bedeutung der Protease bei T. cruzi zu erhalten, wurde die proteolytische Aktivität von Kulturformen (epimastigote Formen) mit der von isolierten Blutformen (trypomastigote Formen) verglichen. Daneben wurden analoge Überstände von Leptomonas pessoai, Leishmania enriettii und Crithidia fasciculata untersucht, also von Flagellaten die, wie in der Diskussion noch näher erläutert werden wird, eine Beziehung zu T. cruzi haben. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Ausgangssuspensionen aller Ansätze (1×10^9 Erreger / ml) gleich war. Dabei zeigte sich, dass sowohl die epimastigote Form wie auch die trypomastigote Form von T. cruzi das Tc-Enzym in der gleichen Grössenordnung beinhalten. Bei L. pessoai und C. fasciculata war die gefundene Aktivität etwa vier mal so hoch, im Gegensatz zu L. enriettii, wo die Aktivität nur ca. 5 % der von T. cruzi betrug (siehe Tabelle 24). Geht man davon aus, dass allein schon die Zählung lebender Flagellaten mit einem beträchtlichen Fehler behaftet sein kann, kann man sagen, dass die spezifischen Protease-Aktivitäten von T. cruzi, L. pessoai und C. fasciculata wahrscheinlich in der gleichen Grössenordnung liegen.

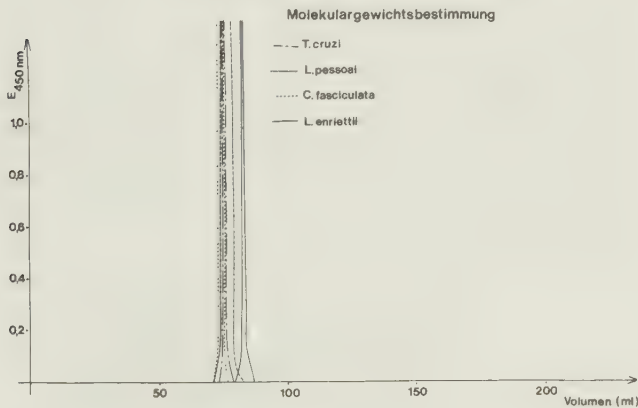
Tabelle 24. Protease-Aktivitäten im Vergleich zu T. cruzi von einigen Flagellaten

Flagellat	Aktivität	Relation
<u>T. cruzi</u> (Kulturform D ₁)	$5,0 \times 10^7$ Keime/TU	1
<u>T. cruzi</u> (Stamm Brasil)	$6,0 \times 10^7$ Keime/TU	0,8
<u>L. pessoai</u>	$1,2 \times 10^7$ Keime/TU	4,2
<u>L. enriettii</u>	$1,0 \times 10^9$ Keime/TU	0,05
<u>C. fasciculata</u>	$1,2 \times 10^7$ Keime/TU	4,2

3.6.2. Molekulargewichtsbestimmung

Die Molekulargewichte der Proteasen von T. cruzi (epimastigote Form), L. pessoai, L. enriettii und C. fasciculata wurden mittels Gel-Filtration miteinander verglichen. Dazu wurden die ungereinigten Überstände der Ausgangssuspensionen an derselben Sephadex G-150 - Säule fraktioniert und die genaue Lage der Enzymaktivität in den Fraktionen bestimmt. Das Ergebnis ist in Abb. 53 dargestellt. Aus der sehr grossen Ähnlichkeit des Elutionsverhaltens aller Enzympräparationen kann geschlossen werden, dass die Molekulargewichte der Proteasen in etwa der gleichen Grössenordnung liegen müssen.

Abb. 53. Molekulargewichtsbestimmung der Proteasen verschiedener Protozoen im Vergleich zu der Tc-Protease



3.6.3. Immunologische Kreuzreaktionen

Nachdem gezeigt war, dass ausser T. cruzi auch L. pessoai, L. enriettii und C. fasciculata eine BAPA spaltende Protease haben, und dass die Molekulargewichte der untersuchten Proteasen in derselben Grössenordnung lag, war die Frage zu beantworten, ob unter ihnen auch eine immunologische Kreuzverwandtschaft besteht. Aus diesem Grunde wurden zunächst die

oben verwendeten Überstände der drei anderen Flagellaten in der Immunelektrophorese und auch in der Immundiffusion gegen das spezifische Kaninchen-Serum ausgetestet, das gegen das hochgereinigte Tc-Enzym gerichtet war. Dabei wurde folgendes Ergebnis erzielt : Nur L. enriettii zeigte in den aufgeführten Immunsystemen keine Reaktion. Dagegen trat in der Immundiffusion (siehe Abb. 54) sowohl gegen L. pessoai wie gegen C. fasciculata eine deutliche Bande auf. Die mit dem Antiserum reagierenden Antigene müssen jedoch ausser ähnlichen Teildeterminanten im Wesentlichen von dem Tc-Enzym - Antigen verschieden sein, was aus der Immundiffusion abzulesen ist : die Präzipitationsbanden scheinen auch nicht teilweise zu konfluieren. Neben diesen Gel-Präzipitationstechniken war natürlich die Frage von besonderem Interesse, ob und in welchem Masse die Funktion der drei Enzyme immunologisch durch das spezifische Anti - Tc-Enzym - Serum beeinflusst werden kann. Hierbei zeigte sich, dass in der Tat alle Enzyme, allerdings in verschiedenem Masse, durch die Antikörper in ihrer Funktion beeinflusst werden (siehe Abb. 55). Besonders auffällig war wiederum, dass die Hemmungen der L. pessoai-Protease und der C. fasciculata-Protease der von T. cruzi am ähnlichsten war. Tabelle 25 zeigt die Hemmung der Proteasen durch das spezifische Anti - Tc-Enzym - Serum (Kaninchen).

Abb. 54. Immundiffusion nach Ouchterlony

- (a) = (c) = (e) = Tc-Protease
 (b) = L. enriettii - Protease
 (d) = L. pessoai - Protease
 (f) = C. fasciculata - Protease
 Mitte = Anti - Tc-Enzym - Serum

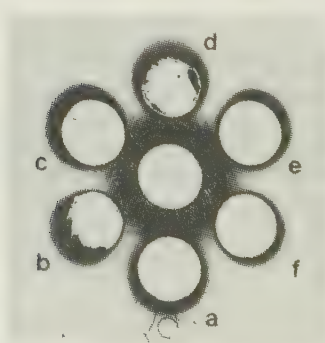


Abb. 55. Einfluss des spezifischen Anti - Tc-Enzym - Serums (Kaninchen) auf die Proteasen verschiedener Protozoen im Vergleich zu T. cruzi

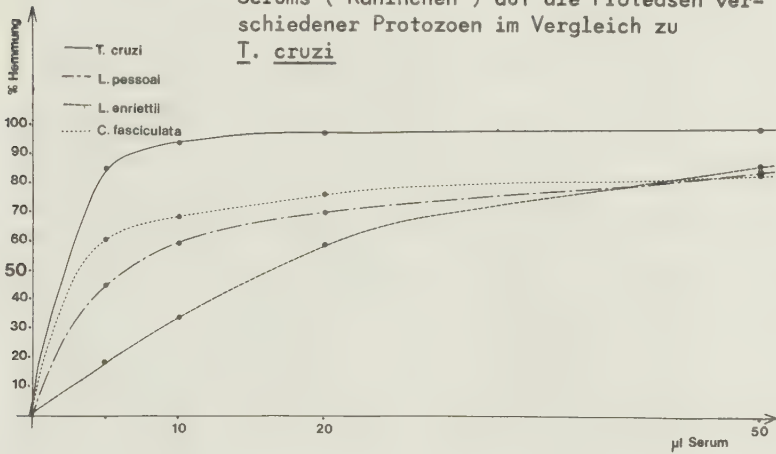


Tabelle 25. Hemmung verschiedener Proteasen durch Kaninchen-Seren

Flagellat	50 µl Anti-Serum % Hemmung	50 µl Normal-Serum % Hemmung
<u>T. cruzi</u> (Kulturform D ₁)	98	0
<u>L. pessoai</u>	80	0
<u>C. fasciculata</u>	81	35
<u>L. enriettii</u>	83	33

4. Diskussion

4.1. Fragestellung

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Isolierung und Charakterisierung einer Protease aus Trypanosoma cruzi. Bereits 1958³⁷ wurde in einem Homogenat epimastigoter Formen von T. cruzi proteolytische Aktivität gefunden, ohne dass dieser Befund in der Folge weiter bearbeitet wurde. Im Rahmen grundlegender biologischer, biochemischer und immunologischer Untersuchungen zum besseren Verständnis der Interaktion zwischen Parasit und obligater Wirtszelle, schien es von grosser Bedeutung, Arbeiten auf dem Gebiet der Enzymausstattung von T. cruzi aufzunehmen. Es war dabei jedoch nicht gedacht an Enzymsysteme wie z.B. dem Krebszyklus, Systemen also, die in tierischen Zellen normalerweise, wenn auch in verschiedenen Aktivitäten, anzutreffen sind. Vielmehr war es das Ziel, solche Aktivitäten zu suchen und zu untersuchen, die in irgendeinem Zusammenhang mit den oben erwähnten Interaktionen stehen können : z.B. Erkennen der Zielzelle, Anhaften, Eindringen, Aktivierung der intrazellulären Synthese oder Ausschleusemechanismen. In dieser Arbeit werden erste Befunde zu diesem Thema vorgelegt, die sich ausschliesslich mit der Isolierung, Charakterisierung und immunologischer Bedeutung einer aus T. cruzi isolierten Protease beschäftigen. Direkter Ausgangspunkt der Arbeit war die Untersuchung von Hungerer, der 1970 (unveröffentlicht) zeigte, dass die Instabilität verschiedener Antigenpräparationen, die für die Durchführung der Serodiagnose

herangezogen werden können, durch das Vorhandensein einer aktiven Protease bewirkt sein kann. Die Aktivität selbst war durch chemische Substanzen hemmbar, nicht aber durch Antikörper im Patientenserum.

4.2. Isolierung und Reinigung der Tc-Protease

Die proteolytische Aktivität wurde wie schon angedeutet zunächst in Homogenaten von Kulturformen von T. cruzi entdeckt. Zunächst wurde deswegen die Frage untersucht, ob auch im Wachstumsmedium gut ausgewachsener T. cruzi - Kulturen eine Enzym-Aktivität nachweisbar war. Aber weder am Ende der Wachstumszeit noch zu irgendeinem anderen Zeitpunkt der Vermehrung konnte die Protease im Medium nachgewiesen werden. Es muss sich also bei diesem Enzym um eine intrazelluläre Protease handeln, und nicht wie die meisten beschriebenen Proteasen anderer Mikroorganismen - z.B. die Strptococcen-Protease⁷⁴ oder Clostripain aus Clostridium hystolyticum⁷⁵ - um eine extrazelluläre Protease.

So wurde die Enzym-Aktivität prinzipiell durch Ultraschall-Behandlung aus den durch Zentrifugation isolierten Trypanosomen freigesetzt, wobei durch Ultrazentrifugation gezeigt werden konnte, dass es sich um ein lösliches, nicht Membran- oder Partikel-gebundenes Enzym handelt. Zwar wurde ein Teil (43 %) der Aktivität nach längerer Ultrazentrifugation (18 Std. bei 154 000 x g) im Sediment gefunden, was aber eher auf ein höheres Molekulargewicht schließen lässt.

Eine Behandlung des Ausgangsüberstandes mit Ammoniumsulfat

zeigte, dass das Tc-Enzym nach Art der Globuline bei Halbsättigung mit Ammoniumsulfat ausfiel. Da bei diesem Versuch jedoch ein sehr grosser Aktivitätsverlust auftrat, wurde dieser Weg der Isolierung nicht weiter verfolgt.

Bei dem Versuch einer Isolierung durch Sephadex Gel-Filtration wurde zunächst eine Sephadex G-100 - Säule eingesetzt. Das Tc-Enzym wurde jedoch nicht eingeschlossen, was wiederum auf ein relativ hohes Molekulargewicht schließen lässt. Dies wurde durch die Adsorption des Tc-Enzyms an einer Sephadex G-200 - Säule bestätigt. Hierbei erfolgte eine gute Trennung von aktivem und inaktivem Material. Eine Kontrolle des Reinigungsgrades der aktiven Fraktion durch Disk-Elektrophorese wies jedoch mehrere Protein-Banden auf. Daher wurde der Versuch unternommen, das Tc-Enzym durch Ionenaustausch-Chromatographie zu isolieren. Eine Fraktionierung an einer DEAE A-50 - Säule ergab eine Adsorption des aktiven Materials mit einer guten Trennung von dem inaktiven Material. Bei einer Kontrolle durch Disk-Elektrophorese zeigten sich jedoch auch hier wiederum mehrere Protein-Banden in der aktiven Fraktion.

Um eine Trennung des Enzyms sowohl entsprechend der elektrischen Ladung wie auch des Molekulargewichtes zu erzielen, wurden beide Isolierungsversuche nacheinander eingesetzt. Eine Kontrolle durch Disk-Elektrophorese zeigte, dass eine Tc-Enzym-Lösung, die durch Ionenaustausch-Chromatographie mit nachfolgender Sephadex Gel-Filtration isoliert wurde, eine einzelne Protein-Bande, die mit der Lokalisierung der enzymatischen Aktivität übereinstimmte, aufwies (Abb. 15 d). Berechnungen der spezifischen Aktivität ergaben

einen Reinigungsfaktor von rund 20 bei einer Ionenaustausch-Chromatographie und einen Faktor von ca. 3 bei einer nachfolgenden Sephadex Gel-Filtration. Somit wurde das Tc-Enzym aus dem Überstand des Trypanosoma-Homogenats mit einem Anreicherungsfaktor von rund 60 isoliert.

4.3. Proteinchemische und kinetische Untersuchungen

4.3.1. Spezifität der Tc-Protease

Wie bei 2.4.1. und 2.4.11. beschrieben, spaltet das Tc-Enzym die eingesetzten hochmolekularen Substrate - Casein, Fibrinogen, Hämoglobin und carboxymethyl-Lysozym (siehe 3.5.3.). Die Spaltung von Hämoglobin und Fibrinogen durch das Tc-Enzym liegt in etwa der gleichen Grössenordnung, wie die Spaltung dieser Substrate durch Trypsin (siehe 3.3.3.), während eine im Vergleich zu Trypsin sehr viel geringere Aktivität bei der Spaltung von Casein gefunden wurde. Von den zunächst eingesetzten niedermolekularen Substraten - den Aminosäure-p-nitroaniliden - wurden allein das α -N-Benzoyl-Arginin-p-nitroanilid (BAPA) und das α -N-Benzoyl-Lysin-p-nitroanilid gespalten. Überraschenderweise wurde unter den gleichen Reaktionsbedingungen das Lysin-p-nitroanilid, bei dem die α -Aminogruppe nicht substituiert ist, nicht gespalten. Die Spaltung von BAPA und α -N-Benzoyl-Lysin-p-nitroanilid sowohl von Trypsin wie auch von dem Tc-Enzym, liess auf eine sehr grosse Ähnlichkeit der Spezifitäten

der beiden Enzyme schliessen, da ja auch Trypsin die Peptidbindungen an den Carboxyl-Gruppen von Arginin und Lysin spaltet⁷⁶.

Die Frage nach den Ähnlichkeiten der Spezifitäten beider Enzyme wurde mit Hilfe der "Fingerprint" - Technik zu beantworten versucht. Abb. 44 zeigt jedoch, dass von einer Identität der Spezifitäten nicht die Rede sein kann; nur ein sehr kleiner Teil der Carboxymethyl-Lysozym-Bruchstücke scheint übereinzustimmen. Diese Disparität wurde durch Ergebnisse der daraufhin unternommenen Spaltung von Oligopeptiden erklärt: neben einem Arginin-Dipeptid (Arginyl-Leucin) konnte auch ein Tryptophan-Dipeptid (Tryptophyl-Glycin) gespalten werden. Auch hier zeigte es sich, dass ein einfaches Lysin-Dipeptid (Lysyl-Glycin) nicht gespalten wurde. Dies liess vermuten, dass die α -Aminogruppe des Lysins zur Spaltung substituiert sein muss. Die daraufhin unternommene Spaltung von Tri-Lysin bestätigte diese Vermutung. Neben Tri-Lysin wurde als weiteres Tripeptid nur noch Glycyl-Histidyl-Glycin eingesetzt, da in der Literatur⁷⁷ Histidin als einer der Wachstumsfaktoren von I. cruzi beschrieben wird. Das Tripeptid wurde jedoch unter den bei 2.4.11.3. angegebenen Reaktionsbedingungen nicht gespalten. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das Tc-Enzym Peptidbindungen spaltet, bei denen die Carboxyl-Gruppen von Arginin, Tryptophan und α -Amino substituiertem Lysin beteiligt sind. Die Art des Substituenten an der Carboxyl-Gruppe scheint die Aktivität

des Tc-Enzyms nicht zu beeinflussen.

Da jedoch die Spaltung des α -Amino-substituierten Lysins mehr zufällig durch den Einsatz von sowohl α -N-Benzoyl-Lysin-p-nitroanilid wie auch Lysin-p-nitroanilid herausgefunden wurde, können die vorliegenden Versuche zur endgültigen Bestimmung der Spezifität des Tc-Enzyms nicht als ausreichend betrachtet werden; Untersuchungen an Oligopeptiden der einzelnen Aminosäuren könnten die vielleicht noch fehlenden Informationen liefern.

Das Tc-Enzym spaltet wie viele andere Proteasen - z.B. Papain, Pepsin, Trypsin⁷⁸ - auch Ester-Bindungen, wobei die Aktivität des Tc-Enzyms in der gleichen Größenordnung liegt wie die des Papains (Spaltung von BAEE). Ähnlich wie z.B. Papain, Trypsin und Chymotrypsin⁷⁹ catalysiert das Tc-Enzym auch Transamidierungsreaktionen (siehe 3.3.5.).

4.3.2. Frage nach dem aktiven Zentrum

Bei der Ammoniumsulfat-Fällung zur Isolierung des Tc-Enzyms wurde, wie schon beschrieben, ein Verlust des grössten Teils der eingesetzten Aktivität festgestellt. Dabei zeigte sich, dass die Dialyse der Schritt war, bei dem der grösste Aktivitätsverlust auftrat.

Der Aktivitätsverlust bei der Dialyse konnte nun durch eine Reihe von Faktoren verursacht worden sein :

- a) Austritt des Enzym-Moleküls durch die Poren des Dialyse-Schlauches

- b) Adsorption des Enzyms am Dialyse-Schlauch
- c) Autolyse des Tc-Enzyms
- d) Zerfall des Tc-Enzyms in inaktive Untereinheiten
durch Ionenverlust
- e) Oxidation des Tc-Enzyms
- f) Verlust eines "Begleit-Proteins"

Da verschiedene Untersuchungen auf ein hohes Molekulargewicht des Tc-Enzyms schliessen liessen, konnte der Verlust der proteolytischen Aktivität durch Austritt des Tc-Enzym-Moleküls durch die Poren des Dialyse-Schlauches bedeuten, dass das Tc-Enzym in Lösung als ein bei der Dialyse leicht zerfallendes Aggregat mehrerer kleiner aktiver Moleküle vorliegt. Da jedoch Versuche mit Dialyse-Schläuchen mit kleinem Ausschluss-limit (bei ca. 5000 Dalton) keinen Hinweis auf den Austritt aktiven Materials ergaben, wurde diese Hypothese verworfen.

Wenn einer Tc-Enzym-Lösung Stückchen des Dialyse-Schlauches zugefügt wurden, so blieb die proteolytische Aktivität der Lösungen - bezogen auf die Kontrollen - auf längere Zeit unverändert, somit konnten die Alternativen (b) und (c) - zur Autolyse und Adsorption - verworfen werden.

Ein Zusatz verschiedener Konzentrationen von Calcium bzw. Magnesium-Ionen konnte den Aktivitätsverlust bei einer Dialyse nicht verringern; auch ein Zusatz von EDTA zeigte keinen augenscheinlichen Einfluss auf die Enzym-Aktivität. Demnach wird das Tc-Enzym nicht - wie z.B. Trypsin⁸⁰ - durch einen Zusatz von Calcium-

oder Magnesium-Ionen stabilisiert. Die Abwesenheit eines hemmenden Einflusses von EDTA lässt annehmen, dass es sich bei der Tc-Protease nicht um ein Metalloenzym handelt und, darüberhinaus, dass die Abnahme der Aktivität während der Dialyse nicht durch den Verlust von Metallionen verursacht sein kann⁸¹. Sollte das Tc-Enzym durch den Verlust eines "Begleit-Proteins" labilisiert werden - wie es z.B. der Fall bei der Protease aus S. mansoni⁸² ist - so müsste der Aktivitätsverlust durch Hinzufügen von entsprechenden Schutz-Kolloiden während der Dialyse zumindest teilweise unterdrückt werden. Keins der eingesetzten Proteine hatte jedoch einen Einfluss auf den Aktivitätsverlust während der Dialyse.

Der Zusatz einer SH-haltigen Verbindung wie z.B. Dithiothreitol (Clelands Reagent, DTT), zeigte demgegenüber nicht nur einen stabilisierenden Einfluss auf das Tc-Enzym im Verlauf einer Dialyse (siehe 3.1.6.), sondern die Aktivität einer hochgereinigten Tc-Enzym-Lösung erhöhte sich sogar 48 Std. nach Zusatz von 5 mM DTT um rund 50 % (siehe Tabelle 13).

Somit kann der Aktivitätsverlust während einzelner Isolierungsschritte im Wesentlichen durch eine Oxidation des Tc-Enzyms erklärt werden.

Dithiothreitol (siehe Cleland, 1964⁷³) wird zum Schutz von Sufhydryl-Gruppen gegen Oxidation verwendet, zur Reduktion von Disulfidbindungen und zur Regeneration von mit einer Reihe von SH-Inhibitoren blockierter SH-Gruppen. Der stabilisierende Einfluss von DTT

auf das Tc-Enzym weist auf die Anwesenheit oxidierbarer Sulphydryl-Gruppen hin, die zur Entfaltung der proteolytischen Aktivität im reduzierten Zustand vorliegen müssen. Die Aminosäure-Analyse ergab dementsprechend auch 2,32 Cystin / 2 - Reste pro 100 Aminosäure-Resten.

Benesch erklärt in seinem Buch "Sulfur in Proteins"⁸³ die möglichen Funktionen von SH-Gruppen in einem Enzym folgendermassen :

- 1) Primäre Funktion bei der Catalyse
 - a) Bei der Kombination mit dem Substrat
 - b) Bei der Kombination mit Cofaktoren und Coenzymen
 - c) Bei der Kombination mit dem Substrat und mit Cofaktoren oder Coenzymen
- 2) Sekundäre Funktion bei der Catalyse
 - a) Reaktion der SH-Gruppe können die quaternäre Struktur des Enzyms verändern
 - b) Substanzen, die mit in der Nähe des catalytischen Zentrums gelegenen SH-Gruppen reagieren, können das Zentrum chemisch oder sterisch beeinflussen.

Die Funktion von SH-Gruppen des Tc-Enzyms könnte somit primäre und/oder sekundäre Bedeutung bei der Catalyse haben. Um diese Funktion näher zu bestimmen, wurde der Versuch unternommen, das Tc-Enzym mit verschiedenen SH-Inhibitoren zu hemmen.

Jodessigsäure, Jodacetamid und N-Äthylmaleinimid zeigten eine geringe Hemmung der Enzym-Aktivität erst bei relativ hohen Konzentrationen. In der gleichen Grössenordnung lag die Hemmung des Tc-Enzyms durch

Cadmium-, Kupfer- und Zink-Ionen (ca. 10^{-4} M). Hg^{++} -Ionen zeigten eine sehr viel stärkere Hemmung des Tc-Enzyms bei der Spaltung von BAPA (siehe 3.2.8.6.). Eine weitere Möglichkeit, Sufhydryl-Gruppen zu blockieren, ist deren Oxidation zu einer S-S - Gruppierung. Dazu wurde der Einfluss von reinem gasförmigen Sauerstoff auf die proteolytische Aktivität untersucht. Es zeigte sich (siehe Abb. 39), dass nach einer Behandlungszeit von 30 Min. rund 70 % der Enzym-Aktivität verloren ging (Aktivitätsbestimmung nach BAPA). Eine Zugabe von 5 mM DTT in den Ansatz verminderte diesen Aktivitätsverlust jedoch erheblich (nur 25 % Hemmung unter analogen Bedingungen).

Diese Ergebnisse reichen allerdings nicht aus, um die Bedeutung von SH-Gruppen bei der Enzym-Catalyse zu bestimmen. Daher wurde der Einfluss von SH-Inhibitoren während der Sauerstoffbehandlung untersucht. Zu diesem Zweck wurden die eingesetzten Konzentrationen von IAA (Jodacetamid) und PMSF (Phenylmethansulfonylfluorid, eine Substanz, die sowohl Sulfhydryl-Proteasen - z.B. Papain⁸⁴ - wie auch Serin-Proteasen - z.B. Trypsin⁸⁵ hemmt) so gewählt, dass das Tc-Enzym allein durch den Zusatz dieser Substanzen nicht gehemmt wurde (das Tc-Enzym wurde durch PMSF bis zu einer Konzentration von 0,1 M nicht gehemmt). Nach einer Vorinkubationszeit mit jeweils einer dieser Substanzen wurde die Lösung einer Sauerstoffbehandlung unterworfen. Es zeigte sich, dass eine Sauerstoffbehandlung von 30 Min., die eine Zusatz-freie Tc-Enzym-Lösung zu 70 %

hemmt, keine Minderung der proteolytischen Aktivität der vorinkubierten Lösungen bewirkte (siehe Tabelle 18). Dies deutet daraufhin, dass die für die quaternäre Struktur wesentlichen SH-Gruppen des Tc-Enzyms durch diese SH-Inhibitoren so blockiert wurden, dass sie einer Oxidation zu S-S - Gruppierungen nicht mehr zugänglich sind. Demnach scheinen sich diese SH-Gruppen nicht im catalytischen Zentrum der Tc-Protease zu befinden. Wahrscheinlich ist, dass bestimmte SH-Gruppen zur Erhaltung der quaternären Struktur keine Disulfid-Bindungen eingehen dürfen, womit wiederum gezeigt ist, dass hier freie SH-Gruppen eine sekundäre Bedeutung bei der Catalyse haben - siehe Abb. 56.

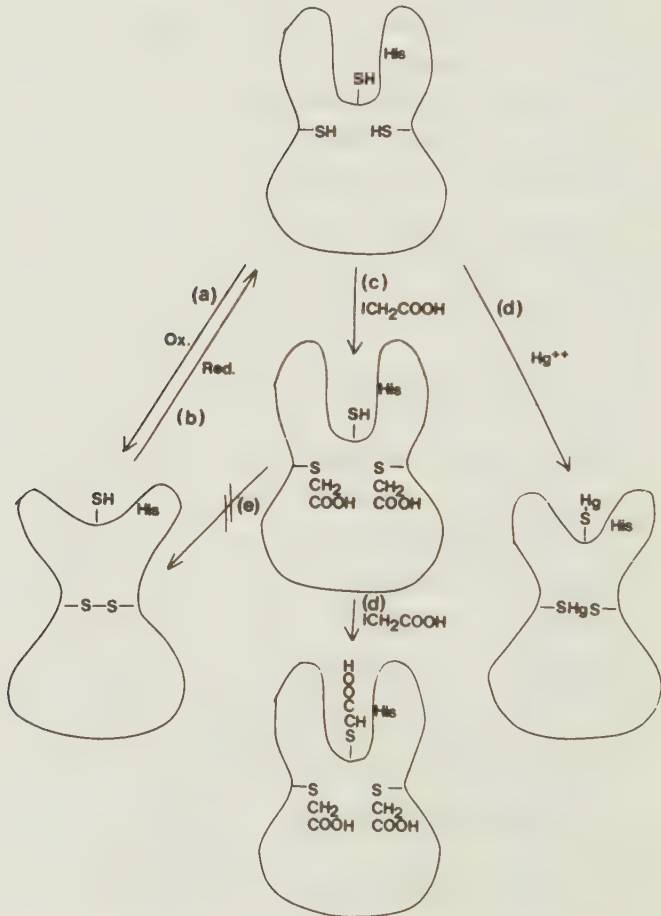
Eine ähnliche Veränderung von enzymatischer Aktivität unter dem Einfluss von Oxidationsmitteln ist in der Literatur zu finden. Gorkin⁸⁶ beschreibt die Verminderung der Kapazität der Monoaminoxidase zur Deaminierung von Monoaminen durch den Einfluss von oxidierenden Substanzen bei einer simultan auftretenden Fähigkeit der Monoaminoxidase, Diamine zu deaminieren. Auch hier tritt eine Veränderung der catalytischen Eigenschaften parallel mit der Veränderung des Oxidationszustandes der SH-Gruppen auf. Die "Transformation" könnte teilweise auch hier auf eine Veränderung der quaternären Struktur zurückgeführt werden, vergleichbar mit der oben dargestellten (analog zu Abb. 56) Veränderung des Tc-Enzym-Moleküls bei einer Oxidation. Der wesentliche Unterschied ist jedoch der, dass durch Oxidation bei der Monoaminoxidase eine

reversible Veränderung der catalytischen Eigenschaften auftritt, während das Tc-Enzym die catalytischen Eigenschaften reversibel verliert (Aktivitätsbestimmung nach BAPA).

Schwierig ist jedoch einen Mechanismus der Hemmung der Enzym-Aktivität durch einbindige Quecksilberverbindungen (wie z.B. Thiocid) zu geben, wenn keine SH-Gruppe im näheren Bereich des aktiven Zentrums vorhanden wäre. Geht man jedoch davon aus, dass auf Grund der sterischen Verhältnisse durch die Knäulung des Moleküls verschieden reaktive SH-Gruppen vorhanden sind, ist folgende Erklärung zulässig : es gibt SH-Gruppen, die benachbart sind und unter Einfluss von Sauerstoff zu S-S - Brücken unter leichter Veränderung der quaternären Struktur oxidiert werden können, was eine Minderung der Aktivität nach sich zieht. Gleichzeitig ist zumindest eine SH-Gruppe in allernächster Nähe des aktiven Zentrums vorhanden, die einerseits nicht durch Sauerstoff zu einer S-S - Brücke oxidiert werden kann, andererseits aber durch bekannte SH-Blocker (verschieden stark) substituiert werden kann, wieder unter Verlust der Enzym-Aktivität (siehe Abb. 56). Darüberhinaus geht aus den Hemmexperimenten mit TLCK (α -N-Tosyl-Lysyl-Chloromethylketon) hervor, dass auch ein Histidin-Rest⁸⁷ im aktiven Zentrum der Tc-Protease angeordnet sein könnte. Dieser Schluss ist jedoch nicht eindeutig, da in der Literatur beschrieben wird, dass neben Histidin auch Cystein⁸⁸ durch TLCK alkyliert werden kann. Kinetische

Abb. 56. Möglicher Mechanismus der Hemmung der Tc-Protease

- (a) Aktivitätsminderung
- (b) Reaktivierung
- (c) Keine Inaktivierung
- (d) Inaktivierung
- (e) Keine oxidative Inaktivierung



Untersuchungen zeigten dementsprechend, dass das Tc-Enzym sowohl durch TLCK als auch durch Thiocid nicht kompetitiv gehemmt wird. Allein die Produkt-Hemmung durch Benzoyl-Arginin war kompetitiver Art.

Ein weiterer Hinweis darauf, dass weniger ein Serin als eher ein Cystein im aktiven Zentrum von ausschlaggebender Bedeutung ist, besteht in dem Befund, dass das Tc-Enzym nicht durch Aprotinin (Boviner Trypsin-Kallikrein Inhibitor) gehemmt wird, von dem bekannt ist, dass es Serin-Proteasen wie z.B. Trypsin zu hemmen vermag⁸⁹.

4.3.3. Chemische Zusammensetzung des Tc-Enzyms

Tabelle 19 zeigt die Aminosäure-Zusammensetzung der Tc-Protease-Lösung. Da die immunologische Charakterisierung des Tc-Enzyms die Anwesenheit mehrerer antigenen Bestandteile in der Tc-Enzym-Lösung zeigte, werden neben dem aktiven Material auch Spuren von Begleit-Proteinen in der Lösung hydrolysiert. Ob diese jedoch einen Einfluss auf die Aminosäure-Zusammensetzung besitzen ist noch nicht geklärt, da es sich bei den Begleit-Proteinen vielleicht - zumindest zum Teil - um inaktive Untereinheiten bzw. Aggregaten der Tc-Protease handeln kann. Dies geht unter anderem daraus hervor, dass tiefgefrorene hochgereinigte Tc-Protease-Lösungen mit der Zeit irreversibel an Aktivität verlieren und anscheinend die Konzentration der Begleit-Proteine zunimmt. Eine Quantifizierung dieser Aussage ist jedoch bei den bisher vorhandenen

Mengen an reinem Protein nicht möglich.

Bei einer Karbohydrat-Bestimmung konnte durch den Reduktionswert nach Park-Johnson ein Anteil von ca. 2 % reduzierender Substanzen, i.e., Zucker, bestimmt werden. Die chromatographische Zuckerbestimmung wurde nur qualitativ ausgeführt, es konnten 3 Hexosen - Glukose, Galaktose und Manose; ein Hexosamin - Glukosamin - und eine Pentose - Xylose - nachgewiesen werden. Ribose und Desoxyribose wurden hingegen nicht gefunden, was auf die Abwesenheit einer Verunreinigung durch Nukleinsäure in den Enzym-Präparaten deutet.

Diese Zuckerbestimmung stimmt mit Ergebnissen aus Arbeiten an Glykopeptiden aus T. cruzi (Hungerer, 1970 - unveröffentlicht - und Colli et al., 1975 und 1976⁹⁰) überein, die die Anwesenheit von Glukose, Galaktose, Manose und Glukosamin beschreiben.

4.4. Immunologische Untersuchungen

4.4.1. Einfluss verschiedener Antiseren auf die Tc-Protease

Das durch DEAE A-50 Ionenaustausch-Chromatographie mit nachfolgender Sephadex G-200 Gel-Filtration isolierte Tc-Enzym zeigte bei einer Disk-Elektrophorese eine einzelne Protein-Bande (Abb. 15 d), die das proteolytisch aktive Material enthält. Dies deutet auf einen sehr hohen Reinigungsgrad der Tc-Enzym-Lösung hin. Das mit Hilfe derartiger Präparate produzierte Immuneserum (Kaninchen) ergab jedoch bei Immunelektrophorese, Immunodiffusion und bidimensionaler Elektrophorese

jeweils mehrere Präzipitationslinien (Abb. 40 und 41). Eine Aktivitätsbestimmung nach BAPA (siehe Abb. 50) zeigte aber, dass nur eine dieser Präzipitationslinien von der Reaktion der Tc-Protease mit dem spezifischen Antikörper stammt. Es muss hier bereits darauf hingewiesen werden, dass eine Reaktion der Tc-Protease mit dem spezifischen Antikörper eine fast vollständige Hemmung des Tc-Enzyms bewirkt, eine Reaktion, auf die später nochmals eingegangen wird. Trotzdem war es möglich, die durch Antigen-Antikörper - Reaktion hervorgerufenen Banden der Tc-Protease durch die Bestimmung der Enzym-Aktivität zuzuordnen. Der Grund dafür liegt in der schon von Heidelberger 1929⁹¹ gefundenen Beziehung, dass die Bande ausschliesslich im Konzentrations-Äquilibrium beider Komponenten entsteht. Auf der einen Seite der Bande besteht dementsprechend ein Überschuss von Antigenen, auf der anderen Seite ein Überschuss an Antikörpern. Dieser Überschuss an Antigenen - hier die Tc-Protease - kann als noch vorhandene Restaktivität bestimmt werden. Ob die anderen Präzipitationslinien durch Verunreinigungen der zum Immunisieren verwendeten Tc-Enzym-Lösung oder durch abgetrennte Untereinheiten des Tc-Enzyms und deren Reaktion mit dem Antiserum sichtbar gemacht, verursacht werden, konnte bisher noch nicht geklärt werden (siehe oben). Sollte es sich um Untereinheiten handeln, was auf Grund des sehr hohen Molekulargewichtes der Tc-Protease sehr gut möglich ist, so sind diese Untereinheiten mit Sicherheit inaktiv, da unter

den verwendeten (bei 2.4.1.1. beschriebenen) Reaktionsbedingungen keine proteolytische Aktivität bestimmt werden konnte.

Hochgereinigte Tc-Enzym-Lösung wurde wie schon angedeutet zur Herstellung von spezifischem Antiserum (Kaninchen) verwendet. Kontrollen mittels Immunelektrophorese, Immunodiffusion und bidimensionaler Immunelektrophorese (Abb. 40 und 50) zeigten eine Präzipitationsreaktion zwischen dem zum Immunisieren verwendeten Tc-Enzym und dem spezifischen Antikörper. Die Antigen-Antikörper-Reaktion der Tc-Protease mit dem Anti-Tc-Enzym-Serum (Kaninchen) hemmte bis zu 98 % der proteolytischen Aktivität bei einer Spaltung von BAPA (siehe Abb. 48), während keine Hemmung durch normales Kaninchen-Serum zu beobachten war. Laut Cinader, 1967⁹², hängt die Hemmkapazität der Antikörper gegen Proteasen von dem Molekulargewicht des Substrats ab : je höher das Molekulargewicht des Substrats, um so stärker die Hemmung der Protease. Dies wird durch immunologische Untersuchungen an einer Reihe von proteolytischen Enzymen - Trypsin⁹⁴, Papain⁹⁵, Bromelin⁹³, Cathepsin D⁹⁶ - nachgewiesen. Bei derartigen Befunden liegt eine sterische Hemmung der Proteasen vor⁹³. Daher deutet die 98 %ige Hemmung des Tc-Enzyms bei der Spaltung eines so kleinen Substrats wie BAPA eher auf eine direkte Reaktion des catalytischen Zentrums des Tc-Enzyms mit den spezifischen Antikörpern, und nicht allein auf eine sterische Hemmung hin.

Ganz anders sieht jedoch das Bild aus, wenn die Antikörper-Hemmung an der Spaltung hochmolekularer Substrate

bestimmt wird. Zwar wird auch die Spaltung von Casein durch das spezifische Antiserum gehemmt, aber auch Kaninchen Normal-Serum hemmt die Reaktion zu einem beträchtlichen Teil. Diese unspezifische Hemmung durch Normal-Serum ist jedoch offensichtlich Spezies-abhängig. So zeigte Ziegen-Normal-Serum keine, während Maus- und Menschen-Normal-Serum nur eine geringe Hemmung bewirkten. Ob diese Unterschiede in der Hemmbarkeit der Tc-Protease durch Normal-Serum, sowie die Schwierigkeit verschiedener Tierspezies (z.B. Maus, Mensch) Antikörper gegen das Tc-Enzym zu bilden, etwa mit der unterschiedlichen Pathogenität von T. cruzi in den verschiedenen Spezies zusammenhängen, ist bisher nicht geklärt. So konnte nur in dem gegen das Gesamthomogenat gerichtete Kaninchen Antiserum Antikörper gegen die Tc-Protease nachgewiesen werden, neben der bereits ange deuteten unspezifischen Hemmung. Bei gleichen oder ähnlichen Untersuchungen in Maus-, Ziegen- und Menschen-Seren konnten keine wesentlichen spezifischen oder unspezifischen Hemmungen gefunden werden. In diesem Zusammenhang muss daraufhingewiesen werden, dass Mensch und Maus als "gute Wirte" und Kaninchen als "schlechter Wirt" für T. cruzi gilt⁹⁷.

4.4.2. Untersuchungen von Proteasen anderer Flagellaten

Kreuz-Reaktionen zwischen zoologisch verwandten Flagellaten werden in der Literatur beschrieben. So wurden Kreuz-Reaktionen zwischen T. cruzi und C. fasciculata (Johnson et al., 1963⁹⁸), T. cruzi und

L. pessoai (Souza et al., 1971⁹⁹) und zwischen I. cruzi und verschiedenen Leishmania und Crithidia-Stämmen (Oelerich, 1973¹⁰⁰) beschrieben. Daher wurden Kulturen von Crithidia fasciculata, Leptomonas pessoai und Leishmania enriettii auf die gleiche Art wie I. cruzi zu einem "Ausgangsüberstand" aufgearbeitet (siehe 2.4.13.). Diese Lösungen wurden auf proteolytische Aktivität untersucht. Es wurde festgestellt, dass jede der untersuchten Flagellaten eine BAPA-spaltende Protease besitzt, und dass die Enzymaktivitäten in I. cruzi, L. pessoai und C. fasciculata in derselben Größenordnung liegen (ca. 10^7 Keime / TU_{BAPA}), während die in L. enriettii gefundene Protease nur etwa 5 % der in I. cruzi gefundenen Aktivität entsprach (ca. 10^9 Keime / TU_{BAPA} , siehe Tabelle 24). Eine Molekulargewichtsbestimmung durch eine Sephadex G-150 Gel-Filtration (siehe 3.6.2.) zeigte, dass die Molekulargewichte der Proteasen aller untersuchten Flagellaten in derselben Größenordnung liegen (siehe Abb. 53).

Wichtig war die Beantwortung der Frage nach der immunologischen Verwandtschaft der einzelnen Enzympräparationen. Dazu wurde zunächst die Kreuz-Reaktion der einzelnen Proteasen mit dem spezifischen Anti-Tc-Enzym-Serum (Kaninchen) in der Immunelektrophorese und Immunodiffusion ausgetestet. Es zeigte sich, dass nur bei dem Ausgangsüberstand von L. enriettii keine Präzipitationsreaktion mit dem spezifischen Antiserum zu beobachten war; während bei L. pessoai und C. fasciculata bei der Immunodiffusion Präzipitationslinien fest-

gestellt wurden (Abb. 54).

Ausser einigen Teildeterminanten muss aber die Anti-genstruktur der untersuchten Proteasen verschieden sein, da keine Konfluenz der Präziptionslinien zu beobachten war. Darüberhinaus zeigt Abb. 55, dass alle Proteasen, wenn auch in verschiedenem Masse, von dem spezifischen Anti-Tc-Enzym-Serum (Kaninchen) gehemmt wurden. Ein Zusatz von 50 μ l Antiserum hemmte 98 % der Aktivität der Tc-Protease und rund 80 % der Aktivität der anderen drei Proteasen (siehe Abb. 55). Im Gegensatz zu der Tc-Protease wurden jedoch die Proteasen von C. fasciculata und L. enriettii auch durch normales Kaninchen-Serum gehemmt (Tabelle 26), nur die Protease von L. pessoai wurde wie die von I. cruzi bei der Spaltung von BAPA durch Normalserum nicht gehemmt.

Auch hier muss gesagt werden, dass eine Erklärung für diese Hemmung sowohl der L. enriettii- wie auch der C. fasciculata-Protease durch Normalserum nicht gegeben werden kann. Es soll nur daraufhingewiesen werden, dass in neueren Arbeiten nur mit L. pessoai eine Kreuz-Protektion gegen eine Infektion mit I. cruzi erzielt werden konnte (Brener et al., 1974¹⁰¹), nicht jedoch mit L. enriettii bzw. C. fasciculata. Ob jedoch zwischen Hemmung der Protease und Kreuz-Reaktion ein Zusammenhang besteht, kann aus diesen Versuchen allein nicht abgelesen werden.

4.4.3. Versuche mit infektiösen T. cruzi (Stamm Brasil)

Alle in dieser Arbeit beschriebenen Versuche wurden mit einer aus epimastigoten Kulturformen von T. cruzi gewonnenen Protease durchgeführt. Da nach dem derzeitigen Wissensstand T. cruzi zum Eindringen in die Zelle in der trypomastigoten Form vorliegen muss, wurde der Versuch unternommen, eine Protease aus trypomastigoten Formen des menschenpathogenen Stammes Brasil zu isolieren. Das Problem bestand zunächst in der geringen Menge lebender Blutformen, die zur Verfügung standen. Trypomastigote Formen können nicht in Nährmedien in grösseren Mengen gezüchtet werden, weswegen diese Formen nur aus dem Blut moribunder Tiere zu gewinnen sind. In den beschriebenen Versuchen wurden deswegen Mäuse hoch infiziert und aus dem Blut nach einer stark modifizierten Methode analog Budzko¹⁰² durch Gradientenzentrifugation die Erreger isoliert. Dabei lieferte eine Maus höchstens 1×10^8 Trypanosomen. Eine weitere Schwierigkeit der Arbeit mit diesen T. cruzi - Formen bestand in deren enormer Infektiosität. Aus diesen beiden Gründen wurde innerhalb der vorgelegten Arbeit nur gezeigt, dass trypomastigote Blutformen von T. cruzi eine Protease besitzen, deren Aktivität berechnet als $TU / 10^7$ Trypanosomen in der gleichen Grössenordnung liegt wie bei den epimastigoten Kulturformen (siehe Tabelle 24).

4.4.4. Untersuchungen zur biologischen Funktion der Protease

Um zu prüfen, ob die Tc-Protease wie schon in der Einleitung angedeutet eine biologische Funktion bei dem Eindringen der Trypanosomen in die Wirtszelle besitzt, wurde zunächst der Versuch unternommen, Mäuse durch Applizieren von Tc-Enzym gegen eine T. cruzi - Infektion zu schützen. Daher wurden Mäuse mit einer Mischung von Tc-Enzym mit verschiedenen Adjuvantien (siehe 2.4.12.2.) subcutan injiziert. Der Challenge mit infektiösen Trypanosomen (Stamm Brasil) zeigte jedoch (siehe Abb. 51), dass diese Immunisierung mit dem Tc-Enzym keine schützende Wirkung für die Tiere verursachte. Da jedoch auch keine Antikörper gegen die Tc-Protease gefunden wurden (Hemmung der proteolytischen Aktivität, Immunelektrophorese, Immunodiffusion), könnte der Misserfolg dieses Versuches auch an der Immunisierungsdosis oder an der Immunisierungsmethode liegen. Aus zeitlichen Gründen wurde dieser Versuch noch nicht variiert.

Da in dieser Arbeit der Tc-Protease die Fähigkeit zugeschrieben wird, durch kurzfristige punktuelle lytische Aktivität das Eindringen der Trypanosomen in die Wirtszelle zu erleichtern, wurden Versuche zur Hemmung dieser Aktivität in vitro unternommen. Der Plan war, die Trypanosomen durch Zugabe des spezifischen Anti-Tc-Enzym-Serums (Kaninchen) zu hindern, in die Zellen einer HeLa-Zellkultur einzudringen. Nachdem die optimalen Versuchsbedingungen (Konzentrations- und Zeitabhängigkeit) bestimmt waren, wurden die

Trypanosomen in Gegenwart bzw. Abwesenheit des Immuns-
serums mit den Zellen inkubiert. Es zeigte sich, dass
bei den unter 2.4.12.3.2. beschriebenen Bedingungen
die Infektionsrate durch Zusatz von 20 % des spezifi-
schen Antiserums um rund 90 % vermindert werden konnte.
Der Einfluss der Kontrollseren (ca. 35 % Hemmung)
kann durch eine unspezifische Hemmung erklärt werden,
ähnlich wie die Hemmung der Spaltung von Casein durch
Seren nicht behandelter Kaninchen.

Das Ergebnis dieser Versuche zeigt, dass die isolierte
Protease möglicherweise eine wichtige Rolle bei dem
Eindringungsmechanismus der Trypanosoma cruzi innehat.

5. Zusammenfassung

- 5.1. Aus einem durch Ultra-Schall-Behandlung gewonnenen Homogenat von Trypanosoma cruzi wurde durch Ammoniumsulfat-Fällung, Gelfiltration an Sephadex G-200 und Ionenaustausch-Chromatographie an DEAE A-50 in Gegenwart von Dithiothreitol eine elektrophoretisch einheitliche Protease gewonnen, die gegen Sauerstoff, Schwermetalle und SH-Reagentien empfindlich ist.
- 5.2. Laut Gel-Filtration, Gel-Elektrophorese und SDS-Elektrophorese beträgt das Molekulargewicht $200\ 000 \pm 20\ 000$; der isoelektrische Punkt liegt bei pH 5,5. Das Enzym ist ein Glykoprotein, das Glukose, Galaktose, Manose, Glukosamin und Xylose enthält; es besitzt Peptidase-, Esterase- und Transamidierungsaktivität. Peptidbindungen werden an der Carboxyl-Gruppe des Arginins, Tryptophans und α -amino-substituierten Lysins gespalten. Die kinetischen Konstanten, sowie Temperatur- und pH-Optimum mit Benzoyl-Arginin-p-nitroanilid als Substrat wurden bestimmt.
- 5.3. Das Enzym enthält essentielle SH-Gruppen, die wahrscheinlich für die Erhaltung der aktiven Konformation als auch unmittelbar für die Catalyse von Bedeutung sind. Die oxydative Inaktivierung beruht wahrscheinlich auf der Bildung einer intramolekularen Disulfidbrücke.
- 5.4. Das Enzym wird durch Antiseren von Kaninchen spezifisch gehemmt. Die Bildung spezifischer Antikörper und eine unspezifische Hemmung des Normalserums des Kaninchens sind

möglicherweise Speziesbedingt, da sowohl bei infizierten Menschen als auch Mäusen keine Antikörper gefunden wurden. Mit der Protease immunisierte Mäuse zeigten keine Resistenz gegen eine T. cruzi - Infektion. In permanenten Zellkulturen von HeLa-Zellen wurde eine signifikante Hemmung der Zellinfektion durch Antiserum des Kaninchens erzielt.

- 5.5. In zoologisch verwandten Flagellaten des T. cruzi liess sich ebenfalls proteolytisch aktives Material nachweisen, das im Molekulargewicht und immunologischen Verhalten der Protease aus T. cruzi sehr ähnlich ist; in der Immunodiffusion wurde jedoch keine Konfluenz der Präzipitationsbanden beobachtet.

Literatur

1. C. Chagas
Bras. Med. 23, 161 (1909)
2. C. Chagas
Bull. Sleep. Sickn. Bur. 1, 252 (1909)
3. M.A. Miles
Parasitology 65, 1 (1972)
4. B. Gavalier
Bol. Maternidad "Concepcion Palacios" (Caracas)
4, 59 (1953)
5. P.F.L. Becker
Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo 17, 187 (1975)
6. A.V. Krettli, Z. Brener
J. Immunology 116, 755 (1976)
7. B. Gönnert
Arzneim. Forsch. 22, 1563 (1972)
8. E. Brumpt
Bull. Soc. Path. Exoth. 6, 172 (1913)
9. F.C. Goble
J. Parasitol. 37, 40 (1951)
10. I.G. Kagan, L. Norman
J. Infec. Dis. 107, 168 (1960)
11. H. Menezes
Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo 10, 1 (1968)
12. S. Seah, P.B. Marsden
Ann. Trop. Med. Parasitol. 63 (2), 211 (1969)
13. M. Meyer, H. Rocha-Lima
Arch. Schiffs- und Tropen Hyg. 18, 101 (1914)
14. J. Muniz, G. Freitas
Bras. Med. 60, 337 (1946)
15. T.S. Hauschka, M.B. Brown, J. Palenquist, E. Goodwin
Am. J. Trop. Med. 30, 1 (1950)
16. I.G. Kagan, L. Norman
J. Infec. Dis. 108, 213 (1961)

17. H. Seneca, P. Peer, B. Hampar
Nature (London) 209, 309 (1966)
18. F.C. Goble
Deutsches Patentamt, Auslegeschrift 1234930 (1967)
19. F. Kierszenbaum, D. Budzko
Infection and Immunity 12, 461 (1975)
20. J. Emmet
J. Parasitol. 36, 45 (1950)
21. W.L. Hanson, J.L. Chien, W.L. Chapman Jr., E.L. Roberson
Z. Parasitenk. 44, 227 (1974)
22. J.F. Fernandes, M. Halsman, O. Castellani
Nature 208, 1005 (1965)
23. J. F. Fernandes, M. Halsman, O. Castellani
Exptl. Parasitol. 18, 203 (1966)
24. W. Trager
The Cell 4, 163 (1964)
25. H. Meyer
Parasitol. 48, 1 (1958)
26. F. Köberle
Rickettsiosen und Protozoen Krankheiten 4, 19 (1972)
27. J.A. Dvorak, T.P. Hyde
Exptl. Parasitol. 34 (2), 268 (1973)
28. A. Berkaloﬀ, J. Bourguet, P. Favard, M. Guinebault
Biologie und Physiologie der Zellen, 1 (1973)
29. M. Shilo, B. Bruff
J. Gen. Microbiol. 40, 317 (1965)
30. M.P. Starr, R.J. Seidler
Ann. Rev. Microbiol. 25, 649 (1971)
31. H. Stolp, M.P. Starr
Ann. Rev. Microbiol. 19, 79 (1965)
32. R.M. Lewert, Chang-Ling Lee
J. Infec. Dis. 99 (1), 1 (1956)
33. M.H. Dresden, H.L. Asch
Biochim. Biophys. Acta 289, 378 (1972)

34. M.A. Stirewalt
Exptl. Parasitol. 34, 382 (1973)
35. E. Reich, D.B. Bifkin, E. Shaw
Proteases and Biological Control, 707 (1976)
36. T. von Brand
Biochemistry of Parasites, 253 (1973)
37. N.B. Gonçalves, E.S. Carmo, B.M. Tavares
6th. Int. Congresses on Tropical Medicine and Malaria
Inst. Med. Trop. (Lisboa), Sept. 1958
38. E. Plessman Camargo, S. Itow
Cons. Nac. Pesquisas do Brasil
3 - 5 Nov. 1975, Caxambú, Brasil
39. F.G. Novy, W.J. Mac Neal
J. Amer. Med. Assoc. 41, 1266 (1903)
40. B.F. Erlanger, N. Kobowsky, W. Cohen
Arch. Biochem. Biophys. 95, 271 (1961)
41. H.M. Raven
Biochemisches Taschenbuch 2, 93 (1964)
42. A.J. Johnson, D.L. Kline, N. Alkjaersig
Thromb. Diath. Haemorrh. 21 (2), 259 (1969)
43. W. Rick
Methods in Enzymatic Analysis 1, 1052 (1974)
44. E.L. Smith, J. Parker
J. Biol. Chem. 223, 1387 (1958)
45. R. Arnon
Methods in Enzymology 19, 228 (1965)
Ed. S.P. Colowick, N.O. Kaplan
46. G. de la Haba, F.S. Camarata, J.S. Fruton
Methods in Enzymology 2, 64 (1965)
Ed. S.P. Colowick, N.O. Kaplan
47. H.U. Bergmayer, E. Bernt, K. Gawelin, G. Michal
Methods in Enzymatic Analysis 1, 182 (1974)
Ed. H.U. Bergmayer
48. H.R. Maurer
Disk Electrophoresis (1968)

49. Laboratoriumsblätter für die medizinische Diagnostik
3 (1971), Behringwerke AG
50. N. Heimbürger, G. Schwick
Thromb. Diath. Haemorrh. Z, 432 (1962)
51. M.H.G. Clarke, T. Freeman
Cli. Sci. 35, 403 (1968)
52. R.C. Allen, H.R. Maurer
Electrophoresis and Isoelectric Focusing in Polyacryl-
amid Gel, 145 (1974)
53. P. Andrews
Biochem. J. 96, 595 (1965)
54. G.A. Banker, C.W. Cotman
J. Biol. Chem. 247, 5856 (1972)
55. J. Margolis, K.G. Keurick
Anal. Biochem. 25, 347 (1968)
56. H. Lineweaver, D. Burk
J. Am. Chem. Soc. 75, 1928 (1953)
57. S. Moore, D.H. Speckman, W.H. Stein
Anal. Chem. 30, 185 (1958)
58. S. Moore
J. Biol. Chem. 238, 235 (1963)
59. J. Edelhoch
Biochemistry 6, 1948 (1967)
60. J.T. Park, M.J. Johnson
J. Biol. Chem. 181, 149 (1949)
61. W.E. Trevelyan, D.P. Procter, J.S. Harrison
Nature 166, 444 (1950)
62. B. Jann
Inaugural Dissertation; Naturwissenschaftlich-Mathema-
tische Fakultät der Albert-Ludwigs-Universität zu
Freiburg (1965)
63. W. Appel
Methods in Enzymatic Analysis 1, 1004 (1974)
Ed. H.U. Bergmayer
64. S. Moore, W.H. Stein
J. Biol. Chem. 211, 893 (1954)

65. E. Stahl
Dünnschichtchromatographie, ein Laboratoriumshandbuch
2. Auflage (1967)
66. Hojas de laboratório para el diagnóstico médico
Fa. Hoechst, Dpto. Behring (1975)
67. Laboratoriumsblätter für die medizinische Diagnostik
3, 1975 - Behringwerke AG
68. V. Sooskri, S. Inoki
Biken Journal 15, 179 (1972)
69. L.V. Ribeiro, E. Kimura, J.F. Fernandes
Rev. Bras. Biol. 29 (3), 295 (1969)
70. J. Paul
Cell and Tissue Culture, 104 (1973)
71. Medizinisch-Chemische Untersuchungsmethoden
Fa. Merck AG (1958)
72. M.C.V. Sauer, A.W. Senft
Comp. Biochem. Physiol. 42 B, 205 (1972)
73. W. Cleland
Biochemistry 3 (4), 480 (1964)
74. Teh-Yung Liu, S.D. Elliott
The Enzymes 3, 610 (1971)
Ed. P.D. Boyer
75. W.M. Mitchell, W.F. Harrington
The Enzymes 3, 699 (1971)
Ed. P.D. Boyer
76. B. Keil
The Enzymes 3, 263 (1971)
Ed. P.D. Boyer
77. R. Zeledon
J. Parasitol. 46 (5), 541 (1960)
78. A.N. Glazer, E.L. Smith
The Enzymes 3, 524 (1971)
Ed. P.D. Boyer
79. J.S. Fruton
The Enzymes 3, 157 (1971)
Ed. P.D. Boyer)

80. N.M. Green, H. Neurath
J. Biol. Chem. 204, 379 (1953)
81. P. Karlson
Kurzes Lehrbuch der Biochemie, 136 (1974)
82. M.C. Saver, A.W. Senft
Comp. Biochem. Physiol. 42 B, 205 (1972)
83. R. Benesch, P.D. Boyer, I.M. Klotz, W.R. Middlebrook,
A.G. Szent-Györgyi, D.R. Schwarz
"Sulfur in Proteins", Proceedings of a Symposium held
at Falmouth, Massachussets, May, 1958
84. A.N. Glazer, E.L. Smith
The Enzymes 3, 515 (1971)
Ed. P.D. Boyer
85. S. Magnusson
The Enzymes 3, 303 (1971)
Ed. P.D. Boyer
86. V. Verovkina, M.M. Abdel Samed, V.Z. Gorkin
Biochim. Biophys. Acta 258, 56 (1972)
87. E. Shaw, S. Springhorn
Biochem. Biophys. Res. Com. 27 391 (1967)
88. J.R. Whitaker, J. Perez-Villasenor
Arch. Biochem. Biophys. 124, 70 (1968)
89. H. Krant, E.K. Frey, E. Bauer
Z. Physiol. Chemie 175, 97 (1928)
90. W. Colli, M.J.M. Alves, R.M. de Lederkramer, B. Zingales,
J.F. da Silveira, M.F. Gonçalves
Conselho de Pesquisas do Brasil
Nov. 1975, Caxambú, Brasil
91. M. Heidelberger, F.E. Kindall
J. Exp. Med. 50, 809 (1929)
92. B. Cinader
Behringwerke Mitteilungen 47, 16 (1967)
93. R. Arnon
The Antigens 1, 87 (1973)
Ed. M. Sela

94. R. Arnon, B. Schlechter
Immunochemistry 3, 451 (1966)
95. E. Shapira, R. Arnon
Biochemistry 6, 3591 (1967)
96. J.T. Dingle, A.J. Barret, P.D. Weston
Biochem. J. 123, 1 (1971)
97. F.C. Goble
Immunity to Parasitic Animals 2, 597 (1970)
Ed. G.J. Jackson, R. Herman, I. Singer
98. P. Johnson, R.A. Neal, D. Gall
Nature 200, 83 (1963)
99. M.C. Souza, J. Roitman
Rev. Inst. Microbiol. 2, 187 (1971)
100. S. Oelerich
Z. Tropenmed. Parasit. 24, 296 (1973)
101. Z. Brener, M.C. Souza, A.P. Reis, W. Dias da Silva
J. Protozool. 21 (4), 579 (1974)
102. D.B. Budzko, F. Kierszenbaum
J. Parasitol. 60 (6), 1037 (1974)

Lebenslauf

Am 2.3.1952 wurde ich als zweites Kind des Dr. Konrad Ernst Bongertz und seiner Frau Maia, geb. Bartscher, in Krefeld geboren.

Eingeschult Ostern 1958 in die Volksschule 48 in Krefeld. Im August 1959 Übersiedlung durch berufliche Veränderung meines Vaters nach Sao Paulo / Brasilien, mit Einschulung im Colégio Visconde de Porto Seguro (ehemalige deutsche Olinda-Schule Sao Paulo). Abschluss dortselbst 1969.

Eignungsprüfung für die Fakultät der Pharmazie und Biochemie der Staatlichen Universität Sao Paulo im Januar 1970. Abschluss mit Erlangung des Diploms für Pharmazeutin und Biochemikerin im Januar 1975.

Von März 1975 bis Dezember 1976 arbeitete ich unter Anleitung von Herrn Professor F. Schneider im Labor von Herrn Doktor Hungerer in der Behringwerken / Marburg an der vorliegenden Arbeit.

